



Programa de Pós-graduação em
Parasitologia - UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

Avaliação do potencial de amostras clínicas de
coleta não invasiva para o diagnóstico molecular
da leishmaniose visceral canina por PCR

Sidney de Almeida Ferreira

Belo Horizonte
Agosto de 2012

SIDNEY DE ALMEIDA FERREIRA

Avaliação do potencial de amostras clínicas de coleta não invasiva para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral canina por PCR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Protozoologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. MARIA NORMA MELO – Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Co-orientador: Antero Silva Ribeiro de Andrade - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear de Minas Gerais (CDTN-MG).

Colaborador: Ricardo Toshio Fujiwara – Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
Agosto de 2012

FINANCIAMENTO

Trabalho realizado nos laboratórios Biologia de *Leishmania*, Sorologia e Imunologia e Genômica de Parasitos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e no laboratório de Radiobiologia do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear de Minas Gerais com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço ao departamento de Parasitologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em nome da professora Érika Martins Braga.

Aos meus pais,
minhas referências e inspiração

AGRADECIMENTOS

Considerando que um trabalho como este não se faz sozinho, faço meus agradecimentos aos que direta ou indiretamente me apoiaram:

Agradeço a Deus, energia que nos humaniza e harmoniza, diz o indizível, transcende o incompreensível.

À minha mãe e a meu pai, sustentáculos e exemplos de vida regida pela honestidade, caráter e generosidade.

Aos meus irmãos, parceiros a quem muito estimo.

À Grazielle Caroline da Silva, difícil de traduzir em palavras o que ela representa para mim e inevitavelmente serei simples demais por mais que eu escreva sobre ela. Então, posso dizer que ela é ordem do meu caos, a saudável agitação na minha “ordem excessiva”, a energia que remedia meu cansaço, fonte de alegria, enfim...o amor da minha vida. Infinitamente, muito obrigado!!!!

À Maria Norma Melo, minha tutora e mentora intelectual com quem tenho uma grande amizade e profundo respeito. Obrigado por todos os seus valiosíssimos ensinamentos.

A Antero Silva que co-orientou este trabalho e nos deu importante apoio logístico e intelectual para concretizar esta tese.

A Rodolfo Giunchetti, Bruno Roatt e toda a equipe que nos atendeu no NUPEB-UFOP. Muito obrigado pela solicitude e boa vontade.

A Ricardo Fujiwara e a toda sua equipe do laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos que nos abriram as portas permitindo uma frutífera colaboração e também importantes ensinamentos.

A toda equipe do laboratório de Biologia de *Leishmania* incluindo as “meninas do Frezárd”, aos alunos de Rodrigo Soares, com quem tive ótimos momentos de convivência e boas gargalhadas. É um privilégio fazer parte de uma equipe de trabalho como essa. Obrigado a todos.

À Soraia e Rosângela, técnicas do laboratório de Biologia de *Leishmania*, pelo relevante apoio técnico-científico, além da grande amizade e conversas descontraídas.

A Gregório Guilherme Almeida, Leonardo Ituassu e Gabriela Vogas, todos da área de Veterinária e fundamentais para as coletas no campo e análise dos cães envolvidos neste estudo. Além disso, agradeço-os pela amizade e importante descontração que deram combustível para o prosseguimento do trabalho.

À Maria do Carmo, Adamastor e toda a equipe do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte-MG, sem os quais, simplesmente não haveria como conceber este estudo. Agradeço a todos vocês pela diligência, boa vontade e conversas muito bem humoradas que fizeram do trabalho uma tarefa mais agradável e natural.

À Cibele e Sumara, da secretaria de pós-graduação em Parasitologia, as quais foram essenciais para a formalização deste trabalho. Um grande abraço!

A toda a equipe do laboratório de Radiobiologia do CDTN-MG, local este onde iniciei minha pós-graduação e onde me foi aberto um rico horizonte de trabalho científico e de importantes amizades.

Ao professor Wagner Tafuri, Aldair e toda a sua equipe que gentilmente nos cederam cães para a realização de testes pilotos de suma importância para este trabalho.

À Rosa, técnica do laboratório de Toxoplasmose do departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, pessoa esta que me ajudou com uma solicitude inigualável tanto para a cessão de reagentes, apoio logístico para experimentos tanto para uma conversa amiga. Sou eternamente grato.

À Elza que me ajudou de forma fundamental na realização dos testes sorológicos. Sou muito grato por sua boa vontade e precisão inigualável para o trabalho em bancada.

A Luiz Henrique Rosa e a toda sua equipe do laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras que nos permitiu usar, em alguns momentos, sua cabine de segurança biológica.

A Sydnei Magno, que gentilmente nos cedeu reagentes importantes para alguns de nossos experimentos e pelos esclarecimentos importantes sobre a leishmaniose visceral canina.

À Eloísa de Freitas que me ensinou práticas fundamentais de laboratório logo no início de meu projeto. Também à sua valiosíssima amizade. Valeu Elo!!!

À Adriane Costa Val e sua aluna Ana Carolina que nos cederam amostras caninas que foram vitais para realizarmos testes pilotos. Muito obrigado!!

Aos grandes amigos Gustavo e Kris Kristofeson, que, mesmo não tendo contato constante, sempre foram, são e serão amigos do peito, que me inspiram e me enriquecem como ser humano. Vocês estarão comigo em todas as minhas investidas na vida. Um eterno obrigado pelo constante apoio!!

A Edmar e Nem (Wermison), grande parceiros nas práticas esportivas e, sem dúvida, grandes amigos com quem sempre tenho garantia de diálogos extremamente produtivos e construtivos.

A Daniel Andrada (Big), Andreza de Souza (e seu apêndice Yuri), Vinícius (Punk), Priscila, Rafael (Rafa), Leo, Margarida e a toda a turma agregada com quem tenho uma grande amizade que não pode ser medida. Valeu galera!!!

A Tiago, do laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos pelos seus grandes esclarecimentos em Bioinformática e pela grande amizade. Também a toda turma animada e agitada deste laboratório com quem realmente o trabalho torna-se quase um passa tempo.

A José Cassimiro, grande amigo e companheiro de reflexões intelectuais e informais, enfim, de todo e qualquer assunto que se torna interessante, criativo e construtivo na presença dessa grande pessoa.

A Eduardo Castro Ferreira, grande parceiro de trabalho científico e grande ser humano com quem tenho uma valiosíssima amizade. Muito obrigado por todo apoio!

Às agências de fomento CNPq, FAPEMIG e CAPES que financiaram este trabalho e que permitiram sua concretização.

Aos membros da banca examinadora por terem gentilmente aceitado participar da avaliação deste estudo: Carlos Nery Costa, Jeffrey Jon Shaw, Célia Gontijo e Héliada Andrade.

A todos que, mesmo em pensamentos, um sorriso ou uma palavra de incentivo, me apoiaram nessa longa jornada. Muito obrigado e seguimos na caminhada da vida...

*“Todos estamos matriculados na escola da vida, em que o
mestre é o tempo”
(Cora Coralina)*

*“A vida é maravilhosa se não se tem medo dela”
(Charles Chaplin)*

RESUMO

O uso de procedimentos simples para coleta de amostras e a realização de um diagnóstico eficiente da leishmaniose visceral canina (LVC) são de grande relevância para auxiliar o controle desta grave doença. Com base nisso, avaliou-se o potencial de amostras clínicas de coleta não invasiva como os *swabs* conjuntival, nasal, oral e *swab* de pele orelha para o diagnóstico molecular da LVC, utilizando-se a reação em cadeia da polimerase convencional (PCR). Além disso, foram avaliadas as cargas parasitárias obtidas destas amostras e suas possíveis implicações, utilizando a PCR em tempo real (qPCR). Para isso, foram utilizados cães naturalmente infectados obtidos no Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte-MG. Dez cães saudáveis e livres de infecção foram adotados como grupo controle. As amostras destes animais foram coletadas em três momentos diferentes. Na primeira coleta, foram obtidos 80 cães que foram divididos em dois grupos de 40 indivíduos de acordo com a ausência (grupo 1) ou presença de sinais clínicos compatíveis com a LVC (grupo 2). Destes animais, foram coletados o *swab* conjuntival separadamente de cada ocular, aspirados de medula óssea, biópsia de pele de orelha e sangue periférico. Estas amostras foram submetidas à PCR-hibridização e à qPCR. Os resultados da PCR-hibridização para os grupos 1 e 2 foram respectivamente: conjuntiva direita, 77,5% e 95%; conjuntiva esquerda, 75% e 87,5%; pele de orelha, 45% e 75%; medula óssea, 50% e 77,5%; sangue periférico, 27,5% e 22,5%. As positivities da PCR-hibridização para o *swab* conjuntival foram equivalentes ($p > 0,05$) ou superiores àquelas referentes às amostras de coleta invasiva ($p < 0,05$). Os dados de qPCR revelaram que as cargas parasitárias cutâneas dos dois grupos de cães foram equivalentes ($p > 0,05$) e mais altas em relação às demais amostras dentro de cada grupo ($p < 0,05$). Os títulos de IgG anti*Leishmania* dos cães com manifestações clínicas foram superiores aos dos cães sem expressão clínica ($p = 0,025$). Correlações positivas e significativas foram detectadas entre os títulos de IgG total e a carga parasitária nos cães sem sinais clínicos apenas quando a medula óssea e a pele de orelha foram consideradas ($p < 0,05$).

A segunda e a terceira coletas envolveram 34 e 28 cães naturalmente infectados respectivamente, dos quais foram coletadas as mesmas amostras clínicas citadas anteriormente, com o acréscimo do *swab* nasal ($n = 62$). Para o diagnóstico qualitativo, todos os materiais coletados desses cães foram submetidos à PCR complexo *Leishmania donovani* específica (cPCR), exceto o sangue periférico. A positividade para o *swab*

nasal foi equivalente àquelas obtidas para as demais amostras, alcançando a frequência de 87% (54/62), ($p > 0,05$). A carga parasitária estimada para o *swab* nasal foi equivalente àquela obtida com o *swab* conjuntival ($p > 0,05$) e inferior ao parasitismo na medula óssea e pele de orelha ($p < 0,05$).

Somente dos cães da terceira coleta ($n = 28$) foram obtidos os *swabs* oral e de pele de orelha, além das demais amostras clínicas já mencionadas. As positivities calculadas para a cPCR foram: 79% (22/28) para o *swab* oral e 43% (12/28) para o *swab* de pele de orelha. O resultado para *swab* oral foi equivalente àquelas das demais amostras clínicas ($p > 0,05$) e superou apenas o dado referente ao *swab* de pele de orelha ($p = 0,013$). A carga parasitária no *swab* oral foi equivalente àquelas estimadas nos *swabs* conjuntival e nasal ($p > 0,05$) e inferior em relação às outras amostras clínicas ($p < 0,05$). Para o *swab* de pele de orelha não foi possível estimar a carga parasitária com a metodologia adotada.

Em suma, as amostras clínicas obtidas com *swab*, exceto o *swab* de pele de orelha, apresentaram importante potencial para o diagnóstico molecular da LVC, pois superaram ou equivaleram-se às amostras de coleta invasiva. Destaque é dado ao *swab* conjuntival que apresentou bom desempenho para o diagnóstico de cães infectados sem sinais clínicos. As cargas parasitárias cutâneas igualmente altas nesses cães impõem um sério desafio para o controle da LVC em regiões endêmicas, dadas as dificuldades em se diagnosticar acuradamente cães infectados sem expressão clínica.

Palavras chave: Diagnóstico, PCR, *Leishmania infantum*, coletas não invasivas, leishmaniose visceral canina.

ABSTRACT

An accurate diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) based on simple procedures for sample collection is very important as an auxiliary measure control of this severe disease. In this work we used conventional PCR to evaluate the potential of clinical samples obtained noninvasively as follows: conjunctival, nasal, oral and ear swabs for the diagnosis of CVL. In addition, we analyzed the parasite loads obtained from these samples and the possible implications using the real time PCR (qPCR). Naturally infected dogs were collected in the Municipal Zoonotic Diseases Control Department of Belo Horizonte-MG. Ten healthy no infected dogs were adopted as control group. The animals were collected in three different moments. Firstly, 80 dogs were obtained and divided into two groups with 40 dogs: group 1 without clinical signs and group 2 with clinical signs. From all these animals, the conjunctival swab from each eye, bone marrow, skin biopsy and peripheral blood were collected and submitted to the PCR-hybridization and qPCR. The frequencies of positive results obtained by kDNA PCR/hybridization for asymptomatic and symptomatic dogs, respectively, were as follows: right conjunctiva, 77.5% and 95.0%; left conjunctiva, 75.0% and 87.5%; skin, 45.0% and 75.0%; bone marrow, 50.0% and 77.5%; and blood, 27.5% and 22.5%. The PCR-hybridization positivity for conjunctival swab was equivalent ($p>0.05$) or higher than those for other samples ($p<0.05$). The qPCR data revealed that the parasite burden in the skin was the highest within each group ($p<0.05$), but there was no statistical difference between them ($p>0.05$). The anti*Leishmania* IgG titers from dogs with clinical manifestations were higher than those from dogs without clinical signs ($p = 0.025$). Positive and significant correlations were detected between parasitism and IgG titers only in the bone marrow and skin from dogs without clinical signs ($p<0.05$).

The second and third collection enrolled 34 and 28 naturally infected dogs respectively. The same clinical samples mentioned above were collected. Additionally, the nasal swab was obtained ($n = 62$). The qualitative diagnosis was carried out with all these samples, except peripheral blood, using PCR with *Leishmania donovani* complex specific primers (cPCR). The positive index obtained from nasal swab was 87% (54/62) and this result was equivalent to those from other samples ($p>0.05$). Its parasite load was statistically equivalent to the parasitism in the conjunctival swab ($p>0.05$) and lower than the parasite burden in the bone marrow and skin ($p<0.05$).

The oral and ear swabs were collected from the last 28 dogs. The cPCR positive results were as follows: oral swab, 79% (22/28); ear swab, 43% (12/28). There was statistical difference between these data ($p = 0.013$) and the positivity obtained from oral swab was equivalent to those from other samples ($p > 0.05$). The parasite burden in the oral swab was equivalent to the parasitism in the conjunctival and nasal swabs ($p > 0.05$) and lower than those estimated in the other samples ($p < 0.05$). It was not possible to assess the parasite load in the ear swab with the qPCR.

In conclusion, the clinical samples obtained noninvasively, except the ear swab, showed an important potential for the molecular diagnosis of CVL because they had a superior or equivalent performance when compared with bone marrow and skin biopsy. A special emphasis is given to the high sensitivity of PCR-hybridization with the conjunctival swab sample for detecting the infection in dogs without clinical signs. The high parasite loads in the skin of dogs with and without clinical signs represent a serious challenge for the CVL control in endemic regions, especially due to the drawbacks to detect the infection in dogs without clinical manifestations.

Key words: Diagnosis, PCR, *Leishmania infantum*, noninvasive collections, canine visceral leishmaniasis.

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	III
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
1) INTRODUÇÃO	1
1.1) <i>A leishmaniose visceral</i>	3
1.2) <i>A importância epidemiológica do cão na Leishmaniose Visceral</i>	5
1.3) <i>A Leishmaniose Visceral no Brasil</i>	9
1.4) <i>A urbanização da Leishmaniose Visceral</i>	11
1.5) <i>Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina</i>	13
1.5.1) <i>Imunodiagnóstico</i>	13
1.5.2) <i>Métodos Parasitológicos</i>	17
2) JUSTIFICATIVA	21
3) OBJETIVOS E HIPÓTESE	24
3.1) <i>Hipótese</i>	25
3.2) <i>Objetivos</i>	25
3.2.1) <i>Objetivo geral</i>	25
3.2.2) <i>Objetivos específicos</i>	25
4) MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1) <i>Cães e aspectos éticos</i>	28
4.2) <i>Delineamento experimental</i>	29
4.3) <i>Coleta de amostras clínicas</i>	33
4.3.1) <i>Swab conjuntival</i>	33
4.3.2) <i>Swab nasal</i>	33
4.3.3) <i>Swab oral</i>	34
4.3.4) <i>Swab da pele de orelha</i>	35
4.3.5) <i>Sangue periférico</i>	35
4.3.6) <i>Biópsia de pele de orelha</i>	36
4.3.7) <i>Medula óssea</i>	36
4.4) <i>Testes parasitológicos</i>	37
4.5) <i>Testes sorológicos</i>	38
4.5.1) <i>ELISA</i>	38

4.5.2) RIFI	39
4.5.3) Bioquímica sérica.....	40
4.6) <i>Extração de DNA</i>	41
4.7) <i>PCR</i>	42
4.8) <i>Eletroforese em gel de agarose</i>	43
4.9) <i>Dot Blot</i>	43
4.10) <i>Hibridização</i>	44
4.11) <i>PCR complexo Leishmania donovani específica</i>	44
4.12) <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida</i>	45
4.13) <i>PCR em tempo real</i>	45
4.13.1) <i>Construção das curvas-padrão</i>	46
4.13.2) <i>Reação da PCR em tempo real</i>	47
4.14) <i>Análise estatística</i>	49
5) RESULTADOS	50
5.1) <i>Grupo controle negativo</i>	51
5.2) <i>Resultados da parte 1: avaliação do swab conjuntival para o diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral Canina</i>	51
5.2.1) <i>Bioquímica sérica – parte 1</i>	51
5.2.2) <i>Sorologia – parte 1</i>	51
5.2.3) <i>PCR-hibridização - grupo 1</i>	55
5.2.4) <i>PCR-hibridização – grupo 2</i>	60
5.2.5) <i>PCR-hibridização – comparação entre cães com e sem manifestações clínicas para Leishmaniose Visceral</i>	64
5.2.6) <i>Identificação das espécies de Leishmania</i>	64
5.2.7) <i>Medidas de sensibilidade e especificidade para PCR-hibridização</i>	67
5.2.8) <i>PCR em tempo real – parte 1</i>	68
5.2.9) <i>Correlação: Títulos de IgG total x carga parasitária</i>	70
5.3) <i>Resultados da parte 2: avaliação do swab nasal para o diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral Canina</i>	70
5.3.1) <i>Bioquímica sérica – parte 2</i>	70
5.3.2) <i>Sorologia – Parte 2</i>	73
5.3.3) <i>PCR complexo Leishmania donovani específica – parte 2</i>	73
5.3.4) <i>Medidas de sensibilidade e especificidade para PCR complexo Leishmania donovani específica – parte 2</i>	77
5.3.5) <i>PCR em tempo real – parte 2</i>	78
5.4) <i>Resultados da parte 3: avaliação dos swabs oral e da pele de orelha para o diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral Canina</i>	79

5.4.1) PCR complexo <i>Leishmania donovani</i> específica – parte 3	79
5.4.2) Medidas de sensibilidade e especificidade para PCR complexo <i>Leishmania donovani</i> específica – parte 3	83
5.4.3) PCR em tempo real – parte 3.....	83
6) DISCUSSÃO	85
7) CONCLUSÕES	102
8) PERSPECTIVAS	105
9) ANEXOS	107
<i>ANEXO 1 - Pareceres do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG</i>	108
<i>ANEXO 2 – Publicações</i>	110
ARTIGO 1	110
ARTIGO 2	117
<i>ANEXO 3 - Ficha para análise clínica dos cães</i>	126
<i>ANEXO 4 - Soluções utilizadas no ensaio imunoenzimático (ELISA)</i>	127
<i>ANEXO 5 - Soluções utilizadas na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)</i>	128
10) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição esquemática da leishmaniose visceral canina em um foco endêmico.....	7
Figura 2: Delineamento experimental da etapa 1 (n=80).....	30
Figura 3: Delineamento experimental da etapa 2 (n=62).....	31
Figura 4: Delineamento experimental da etapa 3 (n=28).....	32
Figura 5: Coleta do <i>swab</i> conjuntival.....	33
Figura 6: Coleta do <i>swab</i> nasal.....	34
Figura 7: Coleta do <i>swab</i> oral.....	34
Figura 8: Coleta do <i>swab</i> da pele de orelha.....	35
Figura 9: Coleta de sangue periférico.....	36
Figura 10: Biópsia de pele de orelha.....	36
Figura 11: Coleta de medula óssea.....	37
Figura 12: Curvas-padrão obtidas com quantidades conhecidas de cópias gênicas de DNA polimerase (A) e β -actina (B).....	48
Figura 13: Parâmetros bioquímicos obtidos de cães com e sem sinais clínicos para LVC naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	53
Figura 14: Medidas de absorvância obtidas do imunoensaio de ELISA para cães sem sinais clínicos (Grupo 1) e com sinais clínicos para LVC (Grupo 2) naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	54
Figura 15: Recíproca dos títulos de IgG total obtidos em cães naturalmente infectados sem sinais clínicos (Grupo 1) e com sinais clínicos para LV (Grupo 2) naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	54
Figura 16: Resultados da hibridização, com sondas de <i>L. infantum</i> , dos produtos de PCR obtidos de <i>swab</i> conjuntival de cães sem sinais clínicos para LV (Grupo 1).....	56
Figura 17: Resultados da hibridização, com sondas de <i>L. infantum</i> , dos produtos de PCR obtidos de amostras clínicas de coleta invasiva de cães sem sinais clínicos para LV (Grupo 1).....	57
Figura 18: Positividades de PCR-hibridização obtidas de amostras clínicas de coleta invasiva em 40 cães sem sinais clínicos para LVC naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Grupo 1).....	59

Figura 19: Resultados da hibridização, com sondas de <i>L. infantum</i> , dos produtos de PCR obtidos de <i>swab</i> conjuntival de cães com sinais clínicos para LV (Grupo 2).....	60
Figura 20: Resultados da hibridização, com sondas de <i>L. infantum</i> , dos produtos de PCR obtidos de amostras clínicas de coleta invasiva de cães com sinais clínicos para LV (Grupo 2).....	61
Figura 21: Positividades de PCR-hibridização obtidas de amostras clínicas de coleta invasiva em 40 cães com sinais clínicos para LVC naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Grupo 2).....	63
Figura 22: Comparação das positivities obtidas da PCR-hibridização para amostras clínicas do mesmo tipo em cães sem e com sinais clínicos para LVC (Grupos 1 e 2 respectivamente) naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	65
Figura 23: Resultados representativos de hibridização dos produtos de PCR com sonda de <i>L. braziliensis</i>	66
Figura 24: Cargas parasitárias estimadas em diferentes amostras clínicas de cães sem sinais clínicos (A) e com sinais clínicos da LVC (B) naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	69
Figura 25: Cargas parasitárias obtidas de <i>swab</i> conjuntival, medula óssea e pele de orelha de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	69
Figura 26: Correlação entre títulos de IgG total e carga parasitária presente em diferentes amostras clínicas de cães com e sem sinais clínicos para LVC e naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	71
Figura 27: Parâmetros bioquímicos obtidos de 62 cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Parte 2).....	72
Figura 28: Medidas de absorbância obtidas do imunoenensaio de ELISA para cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (parte 2).....	73
Figura 29: Gel de poliacrilamida representativo com produtos de PCR referentes ao <i>swab</i> conjuntival de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Parte 2).....	74
Figura 30: Gel de poliacrilamida representativo com produtos de PCR referentes ao <i>swab</i> nasal de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Parte 2).....	74
Figura 31: Gel de poliacrilamida representativo com produtos de PCR referentes a medula óssea de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Parte 2).....	75
Figura 32: Gel de poliacrilamida representativo com produtos de PCR referentes a pele de orelha de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Parte 2).....	75

Figura 33: Positividades para PCR convencional complexo <i>L. donovani</i> específica obtidas de amostras clínicas de coleta invasiva e não invasiva em 62 cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Parte 2).....	76
Figura 34: Cargas parasitárias obtidas de <i>swab</i> conjuntival, <i>swab</i> nasal, medula óssea e pele de orelha de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Parte 2).....	78
Figura 35: Positividades da PCR complexo <i>L. donovani</i> específica obtidas de amostras clínicas coletadas com <i>swab</i> em 28 cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Parte 3).....	80
Figura 36: Gel de poliacrilamida representativo com produtos de PCR referentes ao <i>swab</i> oral de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Parte 3).....	82
Figura 37: Gel de poliacrilamida representativo com produtos de PCR referentes ao <i>swab</i> da pele de orelha de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Parte 3).....	82
Figura 38: Cargas parasitárias obtidas de <i>swab</i> conjuntival, <i>swab</i> nasal, <i>swab</i> oral, medula óssea e pele de orelha de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Parte 3).....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Medidas de eficiência, r^2 e inclinação da reta para as curvas padrão de cada gene alvo de amplificação.....	48
Tabela 2: Comparação entre amostras clínicas de coleta invasiva e não invasiva segundo as frequências de positividade obtidas por PCR seguida de hibridização em cães sem sinais clínicos para LVC naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Grupo 1).....	58
Tabela 3: Comparação entre amostras clínicas de coleta invasiva e não invasiva segundo as frequências de positividade obtidas por PCR seguida de hibridização em cães com sinais clínicos para LVC naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Grupo 2).....	62
Tabela 4: Medidas de sensibilidade e especificidade da PCR-hibridização para diferentes amostras clínicas em 40 cães sem sinais clínicos naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Grupo 1*).....	67
Tabela 5: Medidas de sensibilidade e especificidade da PCR-hibridização para diferentes amostras clínicas em 40 cães com sinais clínicos e naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Grupo 2*).....	68
Tabela 6: Comparação entre amostras clínicas de coleta invasiva e não invasiva segundo as frequências de positividade obtidas por PCR convencional complexo <i>L. donovani</i> específica em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Parte 2).....	76
Tabela 7: Medidas de sensibilidade e especificidade da PCR complexo <i>L. donovani</i> específica para diferentes amostras clínicas em 62 cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> *.....	77
Tabela 8: Comparação entre amostras clínicas de coleta invasiva e não invasiva segundo as frequências de positividade obtidas por PCR convencional complexo <i>L. donovani</i> específica em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> (Parte 3).....	81
Tabela 9: Medidas de sensibilidade e especificidade da PCR complexo <i>L. donovani</i> específica para diferentes amostras clínicas em 28 cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> *.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- EDTA:** “Ethylenediaminetetracetic Acid” (Ácido Etilenodiaminotetracético);
- ELISA:** “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (Ensaio Imunosorbente Ligado à Enzima);
- Gp63:** Glicoproteína de 63 kiloDaltons;
- Hsp70:** “70kDa Heat Shock Protein” (Proteína de Choque Térmico de 70 kiloDaltons);
- kDNA:** DNA de cinetoplasto;
- LC:** Leishmaniose Cutânea;
- LIT:** “Liver Infusion Tryptose”;
- LV:** Leishmaniose Visceral;
- LVC:** Leishmaniose Visceral Canina;
- α MEM:** “Minimum Essential Medium” (Meio Essencial Mínimo);
- OPD:** Orto-Fenilenediamino dihidroclorido;
- ³²P:** Fósforo trinta e dois;
- pb:** Pares de base;
- PCR:** “Polymerase Chain Reaction” (Reação em Cadeia da Polimerase);
- cPCR:** PCR complexo *Leishmania donovani* específica;
- qPCR:** PCR quantitativa em tempo real;
- RIFI:** Reação de Imunofluorescência Indireta;
- SDS:** Sulfato Dodecil de Sódio;
- SSC:** “Solution of Sodium Citrate” (Solução de citrato de sódio);
- TBE:** Tris Borato EDTA;
- TE:** Tris EDTA;
- WHO:** “World Health Organization” (Organização Mundial de Saúde).

INTRODUÇÃO

1) INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Ross 1903) e têm como forma de transmissão mais importante a picada de fêmeas de flebotomíneos infectados (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Vetores do gênero *Lutzomyia* são responsáveis pela transmissão nas Américas e do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Desjeux 1996, Bates 2007).

As leishmanioses possuem uma grande distribuição geográfica e se caracterizam por uma grande diversidade de fatores envolvendo aspectos biológicos, ambientais, ecológicos e sociais, sendo, por isso, consideradas de alta complexidade.

Aproximadamente 21 espécies de *Leishmania* pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, este último presente apenas nas Américas, podem infectar o homem (Lainson & Shaw 1998), dando lugar a uma ampla variedade de quadros clínicos. Esta variação vai desde infecções inaparentes até um amplo espectro de manifestações que acometem a pele, mucosas e/ou órgãos internos.

As manifestações clínicas no homem são dependentes de vários fatores, como a espécie do agente etiológico, sua virulência, a espécie dos vetores envolvidos e aspectos ligados ao hospedeiro, como sua resposta imune e seu status nutricional, dentre outras variáveis. Nesse contexto, as leishmanioses apresentam algumas manifestações clínicas principais.

Leishmaniose Cutânea (LC): se caracteriza pela presença de lesões tegumentares delimitadas, ulceradas ou não, localizadas nas regiões da picada do flebotomíneo. Nesta manifestação clínica, as lesões podem atingir as mucosas da boca, nariz e faringe e causar desfigurações em tecidos moles e cartilagens. Concomitantemente, podem ocorrer metástases ou mesmo tempos depois da cura das lesões primárias. A doença tem progressão lenta ou crônica, e na sua forma cutânea difusa, as lesões podem se disseminar pela pele dos pacientes com resposta imunológica deficiente em relação à *Leishmania* (Silveira et al. 2004).

A Leishmaniose Visceral (LV) ou calazar é considerada a manifestação mais grave da doença, sendo comumente fatal nos casos não tratados. Apresenta desenvolvimento crônico e sistêmico em que os parasitos têm forte tropismo pelas células do sistema fagocítico mononuclear do fígado, baço, medula óssea e tecidos linfóides (Murray et al. 2005, WHO 2010).

Em geral, a infecção caracteriza-se pelo parasitismo das células do sistema fagocítico mononuclear da derme, mucosas ou dos órgãos já citados do hospedeiro mamífero e está associada à alta morbidade na forma tegumentar e à alta mortalidade na forma visceral.

A leishmaniose é endêmica em 98 países distribuídos nos cinco continentes e estima-se que 14 milhões de pessoas estejam infectadas e outras 350 milhões se encontrem em situações de risco de infecção. De acordo com estimativas mais recentes, o número médio de casos anuais de LV registrados está entre 200 e 400 mil, enquanto os casos de LC variam de 700 mil a 1,2 milhão. Mais de 90% dos casos de LV estão concentrados em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. A distribuição da LC é mais ampla ocorrendo nas Américas, região mediterrânea, Ásia ocidental e central e no oriente médio. Dez países apresentam de 70 a 75% dos casos mundiais de LC: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru (WHO 2010, Alvar et al. 2012). Seguramente, estes dados são subestimados, uma vez que nem todas as nações afetadas têm um sistema compulsório de notificação de casos, e mesmo aquelas que o fazem, enfrentam problemas logísticos que aumentam a imprecisão das estimativas (Singh et al. 2006a, Bern et al. 2008).

Outros estudos vêm demonstrando que a leishmaniose está em franca expansão pelo mundo e ocorrências de casos em regiões não endêmicas têm sido recorrentes. As principais causas apontadas para isso são os impactos antrópicos sobre o meio ambiente envolvendo guerras, migrações, globalização e o aquecimento global (Shaw 2007). Estes fatores, juntamente com a coinfeção *Leishmania*-HIV e a resistência de algumas cepas dos parasitos aos tratamentos convencionais, têm contribuído para mudar o perfil epidemiológico da leishmaniose no mundo (Desjeux 2004, Piscopo & Mallia 2006). Embora as leishmanioses ainda estejam fortemente associadas às populações mais pobres (Alvar et al. 2006), novos casos vêm sendo relatados em países desenvolvidos (Shaw 2007).

1.1) A leishmaniose visceral

Dentre as manifestações clínicas das leishmanioses, aquelas da LV são consideradas as mais graves e apresentam alta letalidade nos casos não tratados. Seus agentes etiológicos são as espécies do complexo *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani*.

Sob o ponto de vista epidemiológico, a LV pode ser uma antroponose causada por *L. donovani* ou uma zoonose causada por *L. infantum* (= *L. chagasi*), sendo os cães os principais reservatórios domésticos.

A discussão sobre a sinonímia entre *L. infantum* (Nicolle & Comte 1908) e *L. chagasi* (Cunha & Chagas 1937) gerou muitas controvérsias e a nomenclatura utilizada para o agente etiológico da LV ainda tem sido reportada de forma não padronizada (Dantas-Torres 2006, Lima et al. 2010). Alguns autores argumentam que *L. infantum chagasi* seria uma subespécie com base em características fenotípicas e genotípicas (Lainson & Rangel 2005). No entanto, estudos com base em técnicas bioquímicas e moleculares demonstraram não haver diferenças significativas entre *L. infantum* e *L. chagasi* (Maurício et al. 2000, Leblois et al. 2011). Apesar desta polêmica, há uma forte tendência para adoção do nome *Leishmania infantum* com base na lei da prioridade. Por isso, ao longo deste trabalho, adotaremos essa terminologia para o agente etiológico da LV.

Os países mais afetados pela LV se encontram no sudoeste asiático e na América Latina, onde há grande ônus social provocado por essa doença. Ao todo, existem 65 nações em que a LV é endêmica e estima-se que 200 milhões de pessoas estão sob risco de adquirirem a infecção. De todos os casos humanos da doença registrados anualmente no mundo, cerca de 59.000 repercutem em óbito, contingente este superado apenas pela malária dentre as doenças parasitárias causadas por protozoários (Desjeux 2004, Alvar et al. 2006). No entanto, os dados de mortalidade referem-se apenas às mortes hospitalares, e têm sido obtidos de forma esparsa (Alvar et al. 2012, WHO 2012). O agravamento do quadro clínico da LV está fortemente associado com a desnutrição e a infecção pelo vírus HIV, o que pode aumentar a mortalidade. Além disso, as crianças são um público especialmente afetado pela doença nas regiões endêmicas. Os sintomas mais comuns da LV humana são fraqueza, febre intermitente, anorexia e esplenomegalia com ou sem hepatomegalia (WHO 2010).

A população de menor poder aquisitivo é, sem dúvida, a mais vulnerável à doença. Apesar de existirem métodos de diagnóstico e tratamentos específicos, um grande número de pessoas carece de condições adequadas para acessar estes procedimentos, o que eleva os índices de mortalidade (Gontijo & Melo 2004).

Com base na atual expansão da LV e no aumento expressivo do número de casos humanos, o Programa Especial de Pesquisas e Treinamento em Doenças Tropicais,

vinculado à Organização Mundial de Saúde, passou a considerar essa doença uma prioridade dentre as principais moléstias tropicais (WHO 2010).

1.2) A importância epidemiológica do cão na Leishmaniose Visceral

O cão é considerado o principal reservatório doméstico de *L. infantum*, tanto em áreas rurais como urbanas (Gomes et al. 2007). Isso se deve ao alto grau de parasitismo na pele do animal infectado e à grande susceptibilidade à doença de muitos deles, (Palatnik-de-Sousa et al. 2001). Dessa forma, a ocorrência de infecção de flebotomíneos em regiões endêmicas é facilitada, e o cão assume um papel decisivo na manutenção do ciclo da doença. Em condições favoráveis de transmissão, com alta densidade populacional do vetor e de cães, a infecção pode se espalhar rápida e extensivamente na população canina (Quinnell et al. 1997, Oliva et al. 2006).

Espécies de *Leishmania* causadoras das formas cutânea e mucocutânea da doença também já foram encontradas em cães (Dantas-Torres 2007, Mohebbali et al. 2011). No entanto, o papel desses animais como possível reservatório competente dos agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar ainda é pouco conhecido (Dantas-Torres 2007).

A relação da LV canina (LVC) com o risco de ocorrência da LV humana tem sido tema de intenso debate. Alguns estudos minimizam esta relação ao demonstrarem que a eutanásia em massa de cães soropositivos tem baixo impacto na redução de casos de LV humana em regiões endêmicas do Brasil (Dietze et al. 1997, Miles et al. 1999, Courtenay et al. 2002). Mais de dois milhões de cães foram examinados no Brasil entre 2002 e 2007 e mais de 160.000 cães soropositivos foram eutanasiados. Entretanto, não se observou uma redução da incidência de casos humanos a níveis razoáveis (Lemos et al. 2008). Este fato demonstra que há falhas nas campanhas de controle da LV, e aponta para a necessidade de reavaliação da política de combate à doença no Brasil. Entre as possíveis causas da ineficiência do controle da LV estão as limitações dos testes diagnósticos sorológicos utilizados em larga escala nos inquéritos caninos (Braga et al. 1998, Moreira et al. 2004, Rosário et al. 2005), a demora entre a coleta de amostras clínicas caninas, sua análise e a eutanásia dos cães infectados (Vieira & Coelho 1998, Courtenay et al. 2002, Moreira et al. 2004) e a rápida reposição de cães susceptíveis pela população (Dye 1996, Moreira et al. 2004).

Por outro lado, uma associação significativa entre a eutanásia de cães e a redução da incidência de LV humana já foi detectada (Ashford et al. 1998, Nunes et al. 2010), o que mantém a polêmica discussão sobre a validade desta medida de controle sobre a população canina. A eliminação de cães soropositivos tem mostrado mais eficácia quando realizada sem atrasos e associada a outras formas de controle como o combate ao vetor e o tratamento das pessoas infectadas (Ashford et al. 1998, Braga et al. 1998). A importância epidemiológica dos cães vem sendo reforçada, uma vez que outros estudos têm evidenciado que a LVC se constitui como um fator de risco para a LV humana. Em regiões urbanas, com transmissão recente da LV, foi corroborada a hipótese de que casos caninos da doença precedem casos humanos. Nesses locais, foi comprovada uma associação na distribuição espacial da LV em cães e no homem (Bevilacqua et al. 2001). O reservatório canino tem sido apontado como fator importante para o surgimento de novos focos da doença (Paranhos-Silva et al. 1998). Uma relação próxima entre as infecções canina e humana, especialmente entre crianças, também já foi relatada em países europeus (Sánchez et al. 1996, Papadopoulou et al. 2005).

Segundo estimativas, há cerca de 2,5 milhões de cães infectados na Europa e a LVC continua se expandindo neste continente (Moreno & Alvar 2002, Ferroglio et al. 2005). Na América do Sul, as taxas de infecção canina também são altas, especialmente em algumas regiões do Brasil e da Venezuela (Werneck et al. 2007). No Brasil, a prevalência da infecção nos cães é bastante variável em diferentes regiões, de modo que seus registros variam de 1% até 67% (Coutinho et al. 1985, Paranhos-Silva et al. 1996, França-Silva et al. 2003). Entretanto, tem sido mostrado que a prevalência da infecção canina obtida com os métodos diagnósticos convencionais é subestimada (Solano-Gallego et al. 2001a).

No cão, a doença é geralmente crônica, podendo não haver sinais clínicos sugestivos, ou é caracterizada por uma ou mais das nove principais manifestações clínicas: hiporexia com perda de peso, linfadenopatia local ou generalizada, lesões na pele, lesões oculares, anemia, epistaxe, claudicação, insuficiência renal e diarreia (Ferrer 1999). Em alguns casos, a evolução da doença ocorre de forma aguda ou grave, levando o animal ao óbito em poucas semanas. Em alguns animais, o desenvolvimento da doença pode ser latente, evoluindo, inclusive, para cura espontânea (Genaro 1993). Alguns estudos sugerem que aproximadamente 50% de todos os animais soropositivos infectados não mostram nenhum sinal clínico da doença, e que cerca de 30% destes

animais permitem a infecção de flebotômíneos, o que tem grande importância epidemiológica (Alvar et al. 2004, Quinnell & Courtenay 2009). Outros autores também demonstraram a importância dos cães sem expressão clínica da LV, uma vez que estes animais foram comprovadamente fonte de infecção para o vetor (Molina et al. 1994, Guarga et al. 2000, Courtenay et al. 2002).

Em regiões endêmicas, é fato comprovado que a prevalência da infecção canina é alta, e a maioria dos cães infectados não apresentam sinais clínicos (Berrahal et al. 1996, Solano-Gallego et al. 2001a, Baneth et al. 2008). Com base na epidemiologia da LVC, a frequência de cães com doença clínica em regiões endêmicas deve corresponder à menor parte da população, enquanto que a maioria dos cães é exposta e/ou se infecta sem apresentar sinais clínicos evidentes da LV. Esta distribuição de cães pode ser representada por um diagrama em forma de pirâmide dividida em extratos (Figura 1).

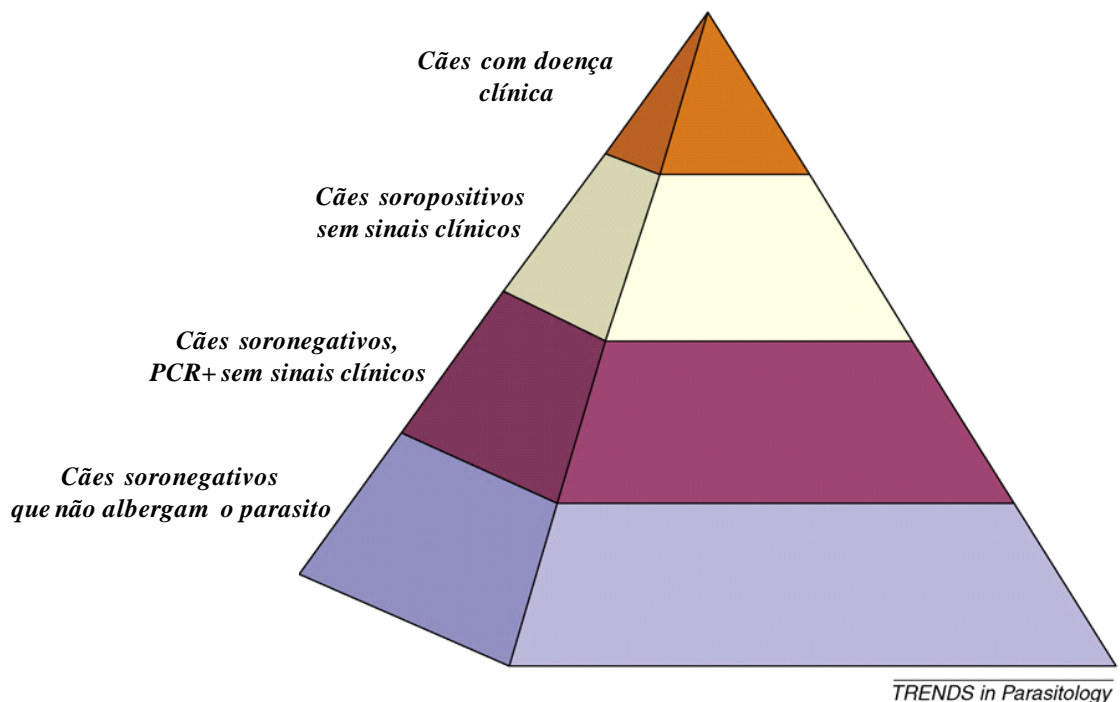


Figura 1: Distribuição esquemática da leishmaniose visceral canina em um foco endêmico. Neste modelo, assume-se que poucos cães da população devem ser soropositivos com PCR negativa (não mostrados), (Baneth et al. 2008).

A importância do sexo, idade e raça canina tem sido estudada por diversos autores mediante levantamentos epidemiológicos. O sexo parece não ser significativo quanto à prevalência da infecção de LV (Amela et al. 1995, Morillas et al. 1996,

Sánchez et al. 1996), embora Fisa et al. (1999) tenha demonstrado que cães machos mais velhos são mais frequentemente infectados. Em relação à idade, algumas pesquisas indicam haver uma distribuição bimodal para os casos de LV registrados, sendo um pico referente a cães com idade entre 2 a 4 anos e outro a cães de 7 anos, fase esta caracterizada por um declínio da resposta imunológica (Alvar et al. 2004, Miranda et al. 2008). Teoricamente, todas as raças caninas são susceptíveis à doença. Diferentemente, a raça “*Ibizian hound*” foi destacada por apresentar um nível de resistência significativo à leishmaniose, uma vez que cães desta raça apresentam intensa resposta imune celular e raramente manifestam sinais clínicos da doença (Solano-Gallego et al. 2000). Outros estudos sugerem que as raças Boxer, Cocker *spaniel*, Rottweiler e pastor alemão são mais susceptíveis ao desenvolvimento da LV (Sideris et al. 1999, França-Silva et al. 2003).

Estudos mais detalhados sobre a susceptibilidade e resistência canina à LV têm revelado que o gene *Slc11c1*, formalmente denominado N-RAMPI, está associado à susceptibilidade dos cães à doença (Altet et al. 2002). Polimorfismos dos genes do complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC II) também têm sido associados à susceptibilidade canina à LV (Quinnell et al. 2003b). Porém, a influência ambiental também é fator importante para a manifestação ou não da doença, de modo que o status nutricional, a presença ou ausência de outras infecções parasitárias concomitantes e a virulência da cepa de *L. infantum* envolvida são fatores extrínsecos ao hospedeiro de grande relevância (Baneth et al. 2008). Nesse contexto, a progressão da doença nos animais infectados é muito variável, podendo o reservatório permanecer em estágio subclínico por meses, anos ou até pela vida inteira (Alvar et al. 2004).

A transmissão da LV entre cães, sem a participação aparente do inseto vetor, tem sido investigada e confirmada em alguns casos. A transmissão transplacentária, embora rara, foi demonstrada no Brasil pela primeira vez por Silva et al. (2009a), e também foi confirmada em cães da raça *Beagle* por Rosypal et al. (2005) nos Estados Unidos. A transmissão venérea também foi reportada recentemente (Silva et al. 2009b). A infecção via transfusão sanguínea também foi registrada, o que chamou atenção para cães potencialmente portadores do parasito e que sejam doadores de sangue em clínicas veterinárias (Freitas et al. 2006). No entanto, tais rotas alternativas de infecção parecem ter pouco peso na história natural e na epidemiologia da LV canina e necessitam de estudos mais aprofundados.

A distribuição geográfica da LV canina tem aumentado, pois casos da doença têm sido detectados, cada vez mais, em regiões não endêmicas. Isso está relacionado, em grande parte, às migrações humanas com cães infectados entre regiões endêmicas e áreas onde o vetor já existe (Arias et al. 1996, Gothe et al. 1997, Teske et al. 2002, Shaw et al. 2003). Essa tendência vem causando preocupação, uma vez que a expansão desta zoonose pode aumentar os riscos de ocorrência da LV humana.

1.3) A Leishmaniose Visceral no Brasil

O primeiro caso de LV no Brasil foi registrado em 1934, a partir da identificação de formas amastigotas em cortes histológicos de fígado de pacientes que morreram sob suspeita de febre amarela (Penna 1934). O primeiro surto da doença foi relatado 20 anos depois em Sobral, no Ceará (Deane 1956).

Inicialmente, a LV no Brasil tinha um caráter essencialmente rural. Nos anos 80, comprovou-se uma importante modificação neste perfil, uma vez que a doença, antes restrita a zonas rurais do Nordeste, avançou para regiões urbanas atingindo periferias de grandes cidades (Gontijo & Melo 2004). Antes desta expansão, a região Nordeste continha 90% dos casos de LV e, segundo dados mais recentes, esta mesma região apresenta cerca de 48% dos casos brasileiros, uma consequência da maior distribuição da LV no país (Brasil 2009). Na década de 90, os estados do Mato Grosso do Sul, Pará, Tocantins, Minas Gerais e São Paulo passaram a contribuir de forma significativa para o aumento dos casos de LV no Brasil (Brasil 2010a).

Nos anos 2000, essa tendência de crescimento foi confirmada, e a taxa de letalidade chegou próxima de 10% (Maia-Elkhoury et al. 2008). Até 2009, casos autóctones de LV foram registrados em mais de 1.600 municípios em 21 dos 27 estados brasileiros e a incidência média anual chegou a 1,9 casos/100.000 habitantes (Maia-Elkhoury et al. 2008, Brasil 2009).

Estes dados indicam que as medidas de combate à LV adotadas até então não foram totalmente eficientes. O programa de controle da LV no Brasil se iniciou na década de 50 e seu objetivo principal era romper os elos epidemiológicos da cadeia de transmissão da doença. Entretanto, os procedimentos de controle adotados têm sido questionados com base na falta de evidências da redução da incidência da LV humana no país. Diante disso, o Ministério da Saúde e a Fundação Nacional da Saúde convocaram um comitê de especialistas para reavaliar o programa e redirecionar as

estratégias de controle (Costa & Vieira 2001). Essa análise vem sendo direcionada com base em argumentos respaldados na literatura especializada e em aspectos operacionais como a falta de padronização dos métodos diagnósticos para a LV humana e canina; discordância entre a eliminação de cães soropositivos e a prevalência da infecção humana; necessidade da comprovação da existência de outros reservatórios, além do cão, como marsupiais e canídeos silvestres; pouco entendimento sobre os reais efeitos das ações de combate ao vetor; possível existência de formas de transmissão sem a participação de flebotomíneos.

Quanto à existência de outros reservatórios de *L. infantum*, alguns estudos têm investigado a possível participação de outros animais na cadeia de transmissão da LV, como por exemplo os equinos (Rolão et al. 2005), felinos (Silva et al. 2010) e roedores (Ferreira et al. 2010).

O Brasil é o país mais afetado pela LV na América Latina, apresentando o maior número de casos humanos e é considerado o terceiro maior foco da doença no mundo (Miles et al. 1999, Brasil 2006, Maia-Elkhoury et al. 2008). O comportamento epidemiológico da doença no país é cíclico e tem apresentado surtos em períodos médios de 5 anos (Alves 2009a). Este comportamento foi claramente observado no país no período entre os anos de 1985 e de 2004 (Werneck 2008).

A LV no Brasil é de grande complexidade, pois a doença se distribui em uma vasta área, apresentando aspectos geográficos, climáticos, ecológicos e sociais muito diferenciados. Observa-se que a doença é mais freqüente em crianças menores de 10 anos, sendo 41% dos casos registrados somente em menores de 5 anos. Isso provavelmente está relacionado à ausência de uma resposta imune celular efetiva agravada pela desnutrição, muito comum em regiões endêmicas, e à exposição ao vetor infectado no peridomicílio. Em termos gerais, o sexo masculino é proporcionalmente mais afetado, chegando a 60% dos casos (Brasil 2003).

Diante desse quadro, alguns aspectos fundamentais sobre a LV no Brasil continuam pouco compreendidos e sob debate, como a real extensão do problema, os fatores de risco para a população, as maneiras pelas quais se pode avaliar o impacto das intervenções de controle e antecipação de epidemias.

1.4) A urbanização da Leishmaniose Visceral

Inicialmente, a LV era considerada como uma enzootia de ocorrência natural no meio silvestre e acidentalmente atingia seres humanos e cães que esporadicamente entravam no ambiente de matas. Posteriormente, a LV passou a ter um caráter endêmico em zonas rurais do Nordeste brasileiro (Deane & Deane 1962). Nas décadas de 70 e 80, casos de LV humana foram detectados em regiões metropolitanas de várias áreas nordestinas, denotando uma grande transição epidemiológica da doença que passou a adquirir um perfil urbano (Werneck 2008).

Desde então, várias cidades brasileiras vêm apresentando, de forma preocupante, mais casos autóctones da doença ao longo das últimas décadas. Entre elas, destacam-se Fortaleza (CE), Natal (RN), São Luís (MA), Camaçari e Feira de Santana (BA), Teresina (PI), Aracaju (SE) Santarém (PA), Palmas (TO), Aquidauana, Corumbá, Três Lagoas e Campo Grande (MS), Várzea Grande (MT), Araçatuba e Bauru (SP), Rio de Janeiro (RJ) e Montes Claros, Paracatu e Belo Horizonte (MG), dentre outras (Brasil 2003, Maia-Elkhoury et al. 2008). Em 2009, foi detectado o primeiro caso de LV na região sul do país no estado do Rio Grande do Sul (Brasil 2010b). Neste contexto, a LV pode ser considerada uma doença emergente e reemergente no Brasil (Alves & Bevilacqua 2004).

Atualmente, a LV apresenta um nítido caráter urbano em diferentes regiões do mundo. A urbanização dessa doença é um fenômeno relatado em diversos países como o Irã (Oshaghi et al. 2010), Marrocos (Boussaa et al. 2005), México (Sánchez-García et al. 2010) e Itália (Tarallo et al. 2010). Acredita-se que este novo panorama tenha relação com diversos fatores, como o adensamento populacional nas grandes cidades, o agravamento das desigualdades sociais concomitante com a precariedade das condições de moradia, alimentação e saneamento básico, o grande número de pessoas susceptíveis, numerosos cães vadios e adaptação do inseto vetor ao ambiente urbano. Além disso, a inadequação dos investimentos em educação e saúde, descontinuidade das ações de controle e fatores associados à resistência do parasito a quimioterápicos e à imunossupressão, como as co-infecções *Leishmania*/HIV, têm sido apontados como causas em potencial da expansão da LV (Reithinger & Davies 2002, Desjeux 2004, Gontijo & Melo 2004, Harhay et al. 2011).

Os impactos ambientais causados pelo homem também são uma forte influência na dinâmica epidemiológica da LV, de forma que os desmatamentos, a poluição e o

aquecimento global podem estar relacionados com a expansão da doença e com seu estabelecimento efetivo nas grandes cidades (Reithinger & Davies 2002, Desjeux 2004).

No Brasil, a presença do vetor foi confirmada no ambiente urbano no final da década de 70. Desde então, os flebotomíneos vem sendo encontrados de forma recorrente em canis, paíóis e até no ambiente intradomiciliar.

Tem sido relatado na literatura que o ambiente propício à ocorrência da LV é geralmente aquele de baixo nível socioeconômico e más condições de saneamento básico. Este cenário é típico dos subúrbios e periferias urbanas brasileiras, onde o inseto vetor pode ser encontrado em grande número (Desjeux 2004). Entretanto, essa caracterização vem se modificando no país principalmente em estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste, onde a LV já ocorre em regiões urbanas mais desenvolvidas (Brasil 2006).

A urbanização da LV no Brasil remonta aos últimos 40 anos, ao longo dos quais, o país passou por importantes alterações na sua estrutura agrária, o que resultou em grande êxodo rural. De acordo com o IBGE, 85% da população brasileira vive nos centros urbanos. Este fato, associado a problemas sócio-econômicos, cria um ambiente favorável para a emergência e reemergência de doenças, como o calazar (Gontijo & Melo 2004).

Belo Horizonte é um claro exemplo da urbanização da LV no Brasil. Nos últimos anos, o número de casos humanos da doença tem aumentado na capital mineira. O primeiro caso registrado foi em 1993 e sabe-se que a LV foi introduzida na cidade a partir de um município vizinho. Até 1999, 345 casos autóctones da doença foram documentados na região metropolitana de Belo Horizonte (RMBH), sendo 223 (65%) pertencentes somente à capital (Silva et al. 2001a). Tem-se verificado, desde então, uma acelerada expansão das leishmanioses na RMBH e uma baixa capacidade de resolução diagnóstica em seus municípios (Luz et al. 2001, Oliveira et al. 2008). Estudos de georeferenciamento em diferentes regionais de Belo Horizonte demonstraram que 84,2% dos casos humanos de LV estavam correlacionados com os casos caninos (Margonari et al. 2006). De 1993 a 2007, foram registrados 994 casos humanos autóctones e 116 óbitos no município mineiro. Mais de 1.400.000 amostras clínicas caninas foram analisadas neste período e constatou-se uma tendência crescente na incidência da doença em humanos e na prevalência canina (Lopes et al. 2010). Admite-se que cerca de 10% da população canina em Belo Horizonte apresenta positividade para a LV e que a alta soroprevalência nos cães representa risco para a infecção

humana. Além disso, a vulnerabilidade ao avanço desta doença tem sido correlacionada com problemas sócioeconômicos como a pobreza e deficiências no serviço de saúde (Caiaffa et al. 2005).

Este cenário comprova e justifica o fato de Belo Horizonte ser a cidade do Sudeste brasileiro que mais chama a atenção em relação ao processo de urbanização da LV. Além disso, a capital mineira apresenta uma das taxas mais altas de prevalência da LV humana do país (Harhay et al. 2011).

O aspecto urbano da LV é claramente composto por grande variedade de fatores que se relacionam mutuamente e por isso, a epidemiologia da doença neste meio é muito complexa. Mais estudos são necessários para melhor compreensão das relações entre os componentes da cadeia de transmissão da LV nas cidades e em seus arredores.

1.5) Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

O diagnóstico preciso da LV canina é de grande complexidade uma vez que muitos cães infectados não apresentam sinais clínicos evidentes, alguns se autocuram e outros podem desenvolver a doença após um longo período. Quando presentes, as manifestações clínicas sugestivas da doença permitem uma avaliação do cão e auxiliam no diagnóstico. No entanto, não há um sinal clínico patognomônico para a LV canina e as características consideradas típicas no animal doente podem se confundir com as de outras enfermidades como erliquiose, babesiose, rickettsiose, neoplasia cutânea, entre outras (Barbosa-de-Deus et al. 2002, Reis et al. 2006a).

A combinação da avaliação clínica com outros métodos diagnósticos torna-se imperativa para um diagnóstico mais seguro. Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para esse fim e podem ser didaticamente divididas em duas modalidades: testes imunológicos e parasitológicos.

1.5.1) Imunodiagnóstico

Este tipo de diagnóstico se baseia na avaliação da resposta imune celular ou humoral resultante da presença do parasito e, portanto, são métodos indiretos de detecção. Em cães, as metodologias mais utilizadas são baseadas na detecção de anticorpos. Estes métodos partem do pressuposto de que os cães infectados passam por uma estimulação policlonal de linfócitos B, que gera hipergamaglobulinemia ou grande produção de anticorpos anti*Leishmania* (Cañavate et al. 2005).

Os testes sorológicos utilizados em maior escala no Brasil para avaliação de cães são o imunoensaio de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ambos respaldados por diferentes estudos que apontaram medidas de sensibilidade e especificidade satisfatórias para estas técnicas. Estes métodos são, portanto, recomendados pelo Ministério da Saúde em inquéritos caninos amostrais e censitários (Dietze 2005).

A RIFI é realizada com base em diluições seriadas do soro do hospedeiro na presença de antígenos de promastigotas de *Leishmania* sp. Os resultados são interpretados com base em uma reação fluorescente que ocorre a partir da ligação de anticorpos anti*Leishmania* com antígenos do parasito (Shaw & Voller 1964, Gradoni 2002). A expressão dos resultados se dá em diluições e, no Brasil, são considerados positivos quando o título obtido é igual ou superior a 1:40 (Brasil 2003). Diferentes trabalhos demonstraram altos índices de sensibilidade e especificidade para a RIFI em regiões endêmicas para a LV (Mancianti et al. 1995, Mettler et al. 2005, Maia et al. 2009) de modo que esta técnica tem sido recomendada como teste sorológico de referência para o diagnóstico da LVC sendo extensivamente utilizada na prática veterinária (Alvar et al. 2004).

O teste ELISA é considerado um importante avanço tecnológico para o diagnóstico da LV, pois permite a avaliação de um grande número de amostras em um curto espaço de tempo, seu protocolo pode ser facilmente adaptado para a utilização de diferentes antígenos e a leitura dos resultados é automatizada. O resultado final é obtido por uma reação enzimática colorimétrica e expresso em densidade óptica, o que torna a leitura mais objetiva (Voller et al. 1976, Reithinger et al. 2002a). Nos inquéritos populacionais, o teste ELISA é considerado mais sensível, porém menos específico do que a RIFI (Mancianti et al. 2002).

Quando antígenos brutos são utilizados para RIFI e ELISA, ocorrem limitações quanto à especificidade e reprodutibilidade destas técnicas (Sundar & Rai 2002, Singh 2006b). No caso da RIFI, exige-se um maior treinamento para sua execução, além de envolver uma reação dispendiosa (Gontijo & Melo 2004). Reações cruzadas podem acontecer com a leishmaniose tegumentar e com a tripanossomíase americana dificultando a aplicação desta técnica em regiões onde há sobreposição dessas doenças com a LV (Sundar & Rai 2002, Porrozzzi et al. 2007, Madeira et al. 2009a). Também tem sido relatado que, tanto a RIFI quanto ELISA, tem sensibilidades menores quando aplicados em cães infectados sem sinais clínicos da LV (Miró et al. 2008). Além disso, a

utilização de diferentes antígenos e a variedade de procedimentos para determinação do ponto de corte (*cut off*) destes testes sorológicos são um entrave para uma adequada padronização dos mesmos (Maia & Campino 2008).

É importante ressaltar que, dentro da população canina, pode ocorrer grande variabilidade quanto à resposta imune frente à infecção por *L. infantum*. Existem cães com altos níveis de anticorpos sendo estes facilmente detectados pelas metodologias disponíveis. Também há animais com claros sinais da doença, porém com sorologia duvidosa ou negativa devido à imunossupressão (Fisa et al. 2001). Existem cães sem manifestações clínicas da LV com níveis muito variáveis de anticorpos e que manifestam a doença após longo período. Finalmente, há aqueles animais infectados que são resistentes, caracterizados por apresentarem altos níveis de interferon-gama e que podem permanecer sem sinais clínicos por toda a vida (Alvar et al. 2004). Este panorama complexo certamente gera importantes variações nas medidas de acurácia dos testes sorológicos.

Estas metodologias de uso mais frequente têm passado por importantes aperfeiçoamentos técnicos e, com isso, vêm alcançando melhores sensibilidades e especificidades. Processos mais refinados de purificação e a tecnologia do DNA recombinante permitiram a obtenção mais eficiente de polipeptídeos contendo epitopos específicos. Um exemplo é o rK39, uma proteína imunodominante específica do complexo *L. (L.) donovani* e que contém epitopos repetitivos (Burns et al. 1993). Esta proteína demonstrou bons resultados quando associada ao teste ELISA, mostrando simplicidade e rapidez para o diagnóstico de cães em grande escala (Scalone et al. 2002). A combinação de diferentes subunidades de antígenos recombinantes como rK9, rK26 e rK39 também foi utilizada com o ensaio de ELISA e esse procedimento aumentou a sensibilidade deste teste sorológico (Rosati et al. 2003).

Badaró et al. (1996), desenvolveram o Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani* (TRALd) que se baseia num método imunocromatográfico no qual a proteína recombinante rK39 é fixada em membrana de nitrocelulose. Esse procedimento se revelou simples e rápido e demonstrou altas sensibilidade e especificidade em cães de área endêmica. No entanto, a mesma técnica foi incapaz de detectar infecção em animais com títulos de RIFI entre 1:40 e 1:320 (Genaro et al. 1997). Mesmo assim, o TRALd é bastante promissor para aplicações em maior escala no campo pois requer pequena quantidade de sangue e sua execução e leitura são bastante práticas.

O teste de aglutinação direta (DAT) tem sido citado como método alternativo para o sorodiagnóstico da LV. Este procedimento é baseado no uso de antígeno estável e liofilizado para a detecção de anticorpos anti*Leishmania* em soros caninos e foi avaliado por Oskam et al. (1996). Os resultados deste trabalho evidenciaram altas sensibilidade e especificidade da técnica. Em estudos comparativos envolvendo diferentes testes sorológicos, o DAT se revelou igualmente sensível, específico e reprodutível como o ELISA (Silva et al. 2006, Ferreira et al. 2007). O DAT apresenta baixo custo e simplicidade, tornando-se atraente para levantamentos epidemiológicos e trabalhos de campo (Rami et al. 2003). No entanto, esta técnica tem especificidade variável de acordo com o antígeno utilizado (Alvar et al. 2004), a obtenção dos resultados é demorada, uma vez que a técnica exige uma incubação de 18 horas e diluições seriadas dos soros, tornando o procedimento mais laborioso (Schallig et al. 2002).

O DAT foi aperfeiçoado a partir de uma variação denominada *Fast Agglutination Screening Test* (FAST) (Schallig et al. 2001, Schoone et al. 2001). Este procedimento combina uma alta concentração de parasitos em um menor volume, requer uma única diluição do soro, fornece o resultado em até 3 horas e apresentou sensibilidade e especificidade elevadas quando comparado ao DAT para o diagnóstico da LV em cães (Schallig et al. 2002, Babakhan et al. 2009). Tecnicamente, o DAT e o FAST apresentam uma grande vantagem ao dispensarem a utilização de conjugado de imunoglobulina específica para o anticorpo anti*Leishmania*. Porém, estas técnicas de diagnóstico ainda necessitam de estudos em larga escala para sua validação.

A mais recente plataforma para o sorodiagnóstico por meio de imunocromatografia é a tecnologia *Dual Path Platform* (DPP). Este é um teste rápido baseado em uma reação de ouro coloidal com os antígenos rK26/rK39 que ocorre quando estes se ligam aos anticorpos do hospedeiro. Esta reação dura cerca de 15 minutos e se revelou bastante prática para uso no campo. Em testes experimentais, este teste apresentou alta sensibilidade para cães com sinais clínicos e alta especificidade para cães sem expressão clínica para LV (Grimaldi Jr. et al. 2012). Este método tem sido cogitado para triagem inicial de cães especialmente em regiões mais remotas com pouca infraestrutura.

1.5.2) Métodos Parasitológicos

Os testes parasitológicos apresentam diferentes metodologias com as quais é possível detectar diretamente o parasito. Dentre eles, os principais são a avaliação citológica e histológica de preparações coradas em lâmina e isolamento do parasito em meios de cultura (Paltrinieri et al. 2010).

Avaliações citológicas e histológicas podem ser realizadas a partir de materiais biológicos como pele, aspirados de medula óssea, baço e linfonodos, a partir dos quais são feitos esfregaços ou impressões em lâminas posteriormente fixadas e coradas por corantes específicos, como, por exemplo, o Giemsa (Alvar et al. 2004, Saridomichelakis et al. 2005). As lâminas são então analisadas ao microscópio óptico para observação de formas amastigotas de *Leishmania*. As análises histológicas também permitem avaliação de processos patológicos numa ampla variedade de tecidos hospedeiros parasitados (Tafuri et al. 2001).

Cultivos de diferentes materiais clínicos como punções de medula óssea, linfonodos, baço e fígado podem ser adicionados a meios de cultura para isolamento do parasito. Para este fim, distintos meios de cultura podem ser utilizados, uma vez que diferentes espécies ou cepas de *Leishmania* têm diferentes taxas de crescimento e/ou requerimentos nutricionais. O material semeado em cultura é armazenado sob condições controladas de temperatura e periodicamente analisados ao microscópio óptico para a identificação de formas promastigotas do parasito crescendo no meio (Evans 1989).

Materiais de biópsia ou aspirados podem ainda ser inoculados em animais de laboratório, geralmente *hamsters*, para verificação posterior do desenvolvimento da doença nestes animais. Com isso, o parasito pode ser posteriormente recuperado a partir de biópsias ou necrópsia do animal experimentalmente infectado (Herwaldt 1999).

O xenodiagnóstico também pode ser utilizado, embora sua aplicação seja muito restrita. Neste caso, é preciso dispor de uma colônia bem estabelecida de flebotomíneos, os quais são induzidos a realizar repasto sanguíneo, sob condições controladas, em animais supostamente infectados. Após um período determinado, os insetos são dissecados e analisados a fresco para identificação do parasito. Sua utilização é mais comum na pesquisa acadêmica e é especialmente importante para investigação de questões epidemiológicas acerca do papel de hospedeiros como possíveis reservatórios. No entanto, seu uso não é indicado para rotina (Maia & Campino 2008).

A especificidade dos métodos parasitológicos pode ser considerada 100%, pois, uma vez encontrado o parasito, confirma-se a presença da infecção. Por isso, muitos autores utilizam este tipo de exame como padrão ouro para a análise de outros métodos de diagnóstico (Rodríguez-Cortés et al. 2010). O estudo do parasito em cultura tem grande importância para a pesquisa acadêmica, pois permite a obtenção de um número suficiente de células para identificação isoenzimática e/ou molecular, imunodiagnóstico com anticorpos específicos, infecção em modelos experimentais e estudo sobre ação de drogas *in vitro* (Maia & Campino 2008).

A imunohistoquímica, por sua vez, é considerada um teste parasitológico de detecção indireta do parasito para o qual se utilizam anticorpos anti-*Leishmania* ligados a conjugados marcados. A presença do agente etiológico é revelada por meio de uma reação enzimática em preparações histológicas com colorações específicas (Hofman et al. 2003, Xavier et al. 2006). Esta técnica tem revelado um aumento na sensibilidade e especificidade do diagnóstico e ainda tem a vantagem de permitir uma análise quantitativa. Por isso, a imunohistoquímica pode ser utilizada para acompanhamento da evolução da doença e de tratamentos específicos em animais infectados (Tafari et al. 2004).

O diagnóstico molecular é outro tipo de método parasitológico e é baseado na detecção de sequências de DNA específicas do parasito sendo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a principal técnica utilizada. Uma vez que ela permite a amplificação da sequência alvo em até 10^9 vezes, esta metodologia tem demonstrado alta sensibilidade superando, em diversos estudos, as outras técnicas convencionais de diagnóstico da LV canina. Sua robustez também tem sido demonstrada com alta especificidade de acordo com o tipo de iniciador utilizado (Reale et al. 1999, Silva et al. 2001b, Manna et al. 2004, Strauss-Ayali et al. 2004).

Este ensaio molecular pode ser realizado com diferentes iniciadores, de acordo com os alvos de detecção desejados. Várias sequências do genoma de *Leishmania* já foram descritas como alvos de amplificação e incluem os genes para o RNA ribossomal e seus espaçadores, β -tubulina, *locus* gp63, hsp70, cisteino-proteinases e minicírculos do DNA de cinetoplasto (kDNA), (Singh 2006b, Reithinger & Dujardin 2007).

A sensibilidade da PCR tem sido ainda mais aperfeiçoada a partir de variações dessa técnica. Pode-se citar a *nested* PCR na qual são feitas duas amplificações consecutivas do alvo. Esta modalidade tem se mostrado rápida, bastante sensível e com um limite teórico de detecção de 0,01 parasito (Cruz et al. 2002).

A PCR, quando associada à hibridização de sondas nucleotídicas radiomarcadas, também tem permitido um aumento na positividade revelando bons resultados no diagnóstico da LV canina (Headington et al. 2002, Ferreira et al. 2008). Estudos demonstram que métodos de marcação isotópica permitem detectar até 0,1pg de DNA alvo. Além disso, estas técnicas permitem uma sensibilidade de detecção significativamente maior e apresentam um custo relativamente menor em relação aos procedimentos de marcação convencionais (Dar & Khan 2004).

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma inovação técnica que permitiu a quantificação de sequências de ácidos nucleicos de forma mais rápida, acurada, reprodutível e sensível (Mary et al. 2004, Paiva-Cavalcanti et al. 2010, Martínez et al. 2011). Dessa forma, tornou-se possível mensurar a carga parasitária a partir de tecidos infectados de maneira mais precisa. Esta plataforma tecnológica ampliou as aplicações tanto para o diagnóstico da LV quanto para a avaliação do sucesso de tratamento quimioterápico em modelos experimentais (Pennisi et al. 2005, Francino et al. 2006, Manna et al. 2008a).

De modo geral, a PCR tem grande versatilidade, uma vez que, para sua realização, podem ser utilizadas pequenas quantidades de diversas amostras clínicas como baço, fígado, medula óssea, linfonodo, sangue periférico, sangue em papel filtro, urina, cultura, entre outras (Tavares et al. 2003, Solano-Gallego et al. 2007, Manna et al. 2008b).

Na era pós-genômica, um crescente número de sequências nucleotídicas tem sido disponibilizado, principalmente pela rede “*Leishmania* Genome Network”. Esses dados são importantes fontes de estudos da função de diferentes genes e podem ser utilizados para aperfeiçoamento do diagnóstico molecular (Gontijo & Melo 2004, Peacock et al. 2007).

A combinação da PCR com métodos sorológicos quantitativos tem sido recomendada para o aumento da eficácia do diagnóstico da LVC (Solano-Gallego et al. 2009). Além disso, a associação da qPCR com a sorologia quantitativa abre novas perspectivas para a avaliação das relações existentes entre a carga parasitária e a produção de anticorpos no hospedeiro (Alves et al. 2009b). Pesquisas mais aprofundadas sobre estas variáveis são muito importantes para auxiliar na identificação de possíveis marcadores de doença ou resistência canina à LVC bem como de processos relacionados ao prognóstico da enfermidade.

Em suma, verifica-se que a LVC é uma doença de grande importância e complexidade, pois causa forte impacto na saúde pública brasileira e mundial e apresenta crescente urbanização em Belo Horizonte e em diversas regiões do Brasil e do mundo. Além disso, as formas de se diagnosticar a presença da infecção são diversas e limitadas quando utilizadas isoladamente. Por isso, os mecanismos de controle necessitam de constante vigilância e aperfeiçoamento, uma vez que a incidência da LV tem aumentado em diversas regiões. Certamente, o diagnóstico correto da LVC é uma peça chave neste contexto. No presente estudo, propomos a avaliação do potencial de amostras clínicas de coleta não invasiva para o diagnóstico molecular da LVC, estimativa de carga parasitária e sua relação com a produção de anticorpos anti*Leishmania*.

JUSTIFICATIVA

2) JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial de Saúde recomenda três medidas de controle básicas para a LV: diagnóstico e tratamento precoce das pessoas infectadas, combate ao vetor com inseticidas de ação residual e diagnóstico e eliminação dos cães infectados (WHO 2010). Portanto, a detecção da infecção, tanto em humanos quanto em cães, é uma etapa fundamental para o controle da doença, e inquéritos extensivos para a sondagem de animais infectados têm sido preconizados. Diante das dificuldades operacionais de combate à LV, especialmente nas regiões urbanas, tornam-se necessários mais investimentos na área técnico-científica e aperfeiçoamento das estratégias de controle e vigilância da doença.

Dado que os cães são considerados os principais reservatórios domésticos de *L. infantum*, é fundamental que esses animais sejam rotineiramente monitorados. O diagnóstico correto é muito importante para evitar a eliminação de cães não infectados e para identificar adequadamente aqueles com infecção.

Embora importantes avanços tecnológicos tenham ocorrido, ainda não existe um padrão ouro ou um método absolutamente preciso para o diagnóstico da LV canina. Atualmente, permanece o desafio para obtenção de um método suficientemente sensível, específico, simples, rápido e de baixo custo.

Um diagnóstico eficiente é crucial para os inquéritos epidemiológicos, que darão suporte às decisões políticas direcionadas às regiões onde as medidas de controle são mais urgentes e necessárias. Portanto, a pesquisa de técnicas alternativas que estejam de acordo com esses critérios se faz necessária. Vale ressaltar que isso se constitui numa das metas prioritárias para auxiliar a prevenção, vigilância e controle da LV. O investimento em procedimentos de diagnóstico vem sendo apontado como necessário para auxiliar e orientar intervenções para a redução da morbidade e mortalidade dessa doença, bem como para a diminuição dos riscos de transmissão.

Neste contexto, a utilização de procedimentos não invasivos de amostragem para o diagnóstico é relevante, pois representam alternativas mais simples e não traumáticas aos hospedeiros.

Um exemplo que tem se mostrado promissor é a utilização do *swab* para coleta de amostras biológicas para o diagnóstico molecular da LVC. Este método de coleta é fácil e rápido, além de ser um procedimento não invasivo que permite a obtenção de células de diferentes regiões anatômicas do hospedeiro, como as mucosas conjuntival,

nasal e oral. As mucosas do hospedeiro são regiões normalmente colonizadas pelo parasito e por isso são alvos propícios para a detecção do mesmo. Além disso, as mucosas são tecidos de constante reposição celular e, portanto, as células exfoliativas daí provenientes podem ser facilmente coletadas utilizando-se *swabs*. Por ser naturalmente parasitada, a pele de cães infectados é um alvo estratégico para a detecção de parasitos, dada a importância epidemiológica deste tecido. O *swab* pode ser utilizado para coleta de células epidérmicas e ter seu potencial comparado a métodos de coleta convencionais e invasivos de pele, como a biópsia. Com isso, torna-se estratégico e relevante avaliar a combinação da praticidade destas amostras clínicas de coleta não invasiva com a robustez da técnica de PCR para o diagnóstico da LVC. Os testes moleculares podem ser especialmente úteis para confirmação diagnóstica de cães imunossuprimidos, de casos sub-clínicos ou suspeitos que apresentem reações cruzadas em testes diagnósticos sorológicos. Além disso, a PCR quantitativa tornou-se uma ferramenta valiosa para acessar a carga parasitária em diferentes amostras clínicas.

Com base nisso, entendemos que a presente pesquisa parte da necessidade de se criar subsídios para desenvolver métodos auxiliares mais simplificados e eficientes de diagnóstico para a LVC.

OBJETIVOS E HIPÓTESE

3.1) HIPÓTESE

“Amostras clínicas de coleta não invasiva obtidas com *swab* apresentam alto desempenho para o diagnóstico molecular da LVC por PCR”.

3.2) OBJETIVOS

3.2.1) Objetivo geral

Avaliar o potencial de amostras clínicas de coleta não invasiva obtidas com *swab* para o diagnóstico molecular por PCR da LVC em cães naturalmente infectados provenientes de região endêmica.

3.2.2) Objetivos específicos

- Comparar o desempenho do *swab* conjuntival para o diagnóstico molecular da LVC por PCR seguida de hibridização entre grupos de cães naturalmente infectados com e sem sinais clínicos compatíveis à doença;
- Comparar, dentro de cada grupo de cães, os resultados obtidos por PCR-hibridização do *swab* conjuntival com aqueles obtidos de biópsia de pele de orelha, medula óssea e sangue periférico;
- Avaliar e comparar o desempenho dos *swabs* nasal, oral e *swab* da pele de orelha com o de *swab* conjuntival, biópsia de pele de orelha e aspirados de medula óssea para o diagnóstico da LVC por PCR convencional de cães naturalmente infectados;
- Avaliar a sensibilidade e especificidade dos métodos de PCR-hibridização e PCR convencional para cada amostra clínica investigada;
- Estimar e avaliar a carga parasitária presente nas amostras clínicas estudadas em todos os cães naturalmente infectados por meio da PCR em tempo real;
- Avaliar os níveis de imunoglobulinas da classe IgG nos soros dos cães naturalmente infectados com e sem expressão clínica para a LVC;
- Verificar a associação entre as cargas parasitárias estimadas e o título de anticorpos IgG total dos cães naturalmente infectados com e sem sinais clínicos para a LVC;

- Estabelecer, dentre as amostras clínicas investigadas, aquela que se mostrar mais adequada para o diagnóstico molecular da LVC no presente contexto experimental.

MATERIAIS E MÉTODOS

4) MATERIAIS E MÉTODOS

4.1) Cães e aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (nº de protocolo 183/08). Foi utilizado um total de 142 cães naturalmente infectados, de ambos os sexos, de idade desconhecida, sem raça definida e destinados à eutanásia por apresentarem soropositividade para ELISA e RIFI conforme a legislação específica vigente. Estes animais foram obtidos e cedidos pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte (CCZ-BH) durante os serviços rotineiros de triagem canina. Todos os cães passaram por uma detalhada avaliação clínica e os dados foram registrados em fichas individuais (Anexo 3).

Foram incluídos neste estudo cães com resultados positivos para o teste de mielocultura e/ou para os testes de ELISA e RIFI simultaneamente utilizando-se antígenos de *L. infantum* (tópicos 4.5.1 e 4.5.2). Como pré-requisito de inclusão, todos os cães apresentaram positividade para ELISA e RIFI realizados conforme protocolos adotados pela equipe do CCZ-BH.

Os animais incluídos neste estudo foram coletados em três momentos diferentes. Na primeira coleta, foram obtidos 80 cães, os quais foram divididos em dois grupos. O grupo 1 incluiu 40 animais sem sinais clínicos da doença e o grupo 2, 40 cães apresentando sinais clínicos sugestivos de LVC, tais como onicogrifose, linfadenopatia, emagrecimento, hiperkeratose, dermatite, perda de peso, lesões oculares, alopecia e lesões cutâneas. Posteriormente, foram realizadas a segunda e terceira coletas com 34 e 28 cães respectivamente.

Dez animais saudáveis de ambos os sexos, sem raça definidas e criados em canil maternidade, foram utilizados como grupo controle negativo (sem infecção). Estes cães foram mantidos em ambiente telado, sob condições controladas de alimentação e foram cedidos pelo Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

Ao longo deste trabalho, foram utilizadas as terminologias “com sinais clínicos e sem sinais clínicos” da LV, ou expressões equivalentes, para os dois grupos distintos de animais estudados. Isto parte de uma definição técnica da *United States National Library of Medicine*, segundo a qual, o termo *sintoma* significa: “evidência subjetiva da doença ou desordem física observada pelo paciente”, e o termo *sinal* é “uma evidência

objetiva de doença ou desordem física”. A partir disso, considerou-se mais apropriado não utilizar os termos “assintomático e sintomático” para cães e sim cães com sinais clínicos e sem sinais clínicos da doença.

4.2) Delineamento experimental

Para a realização deste trabalho, foram coletados sete tipos de amostras clínicas: *swabs* conjuntival, nasal, oral e da pele de orelha, aspirados de medula óssea, biópsia de pele de orelha e sangue periférico. Na primeira coleta (n = 80), foram coletados o *swab* conjuntival, medula óssea, biópsia de pele de orelha e sangue periférico. A segunda e a terceira coletas envolveram 34 e 28 cães naturalmente infectados respectivamente, dos quais foram coletadas as mesmas amostras clínicas citadas na primeira coleta com o acréscimo do *swab* nasal (n = 62). Dos últimos 28 cães foram coletados adicionalmente o *swab* oral e *swab* da pele de orelha. Portanto, por razões didáticas, o presente estudo foi dividido em três partes, cada qual com uma ou mais amostras clínicas de coletas não invasivas adotadas como referencial de comparação: Parte 1 com o *swab* conjuntival (n = 80), Parte 2 com o *swab* nasal (n = 62) e Parte 3 com o *swabs* oral e da pele de orelha (n = 28). O delineamento experimental de cada etapa está esquematizado nas Figuras 2, 3 e 4.

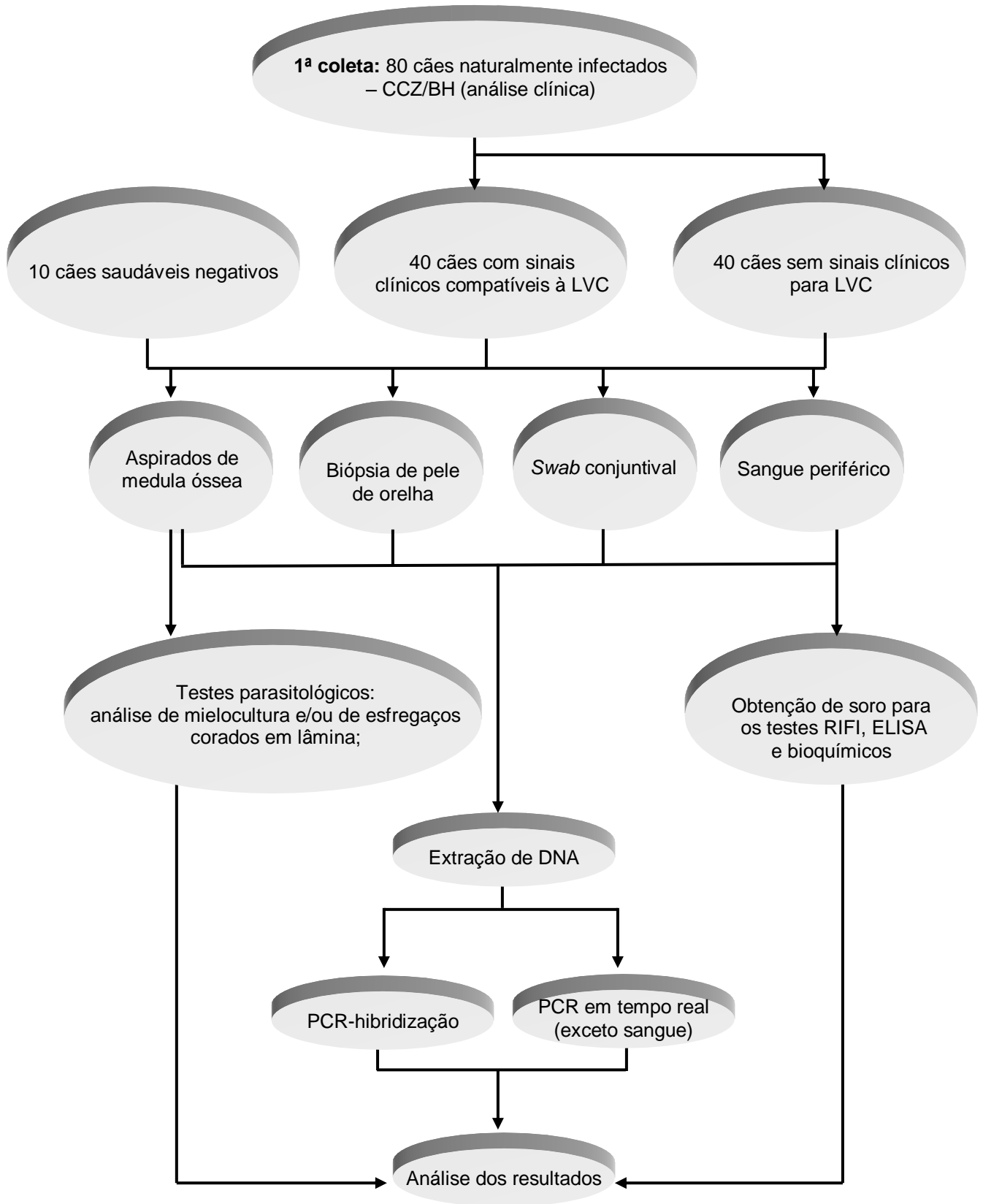


Figura 2: Delineamento experimental da etapa 1 (n = 80).

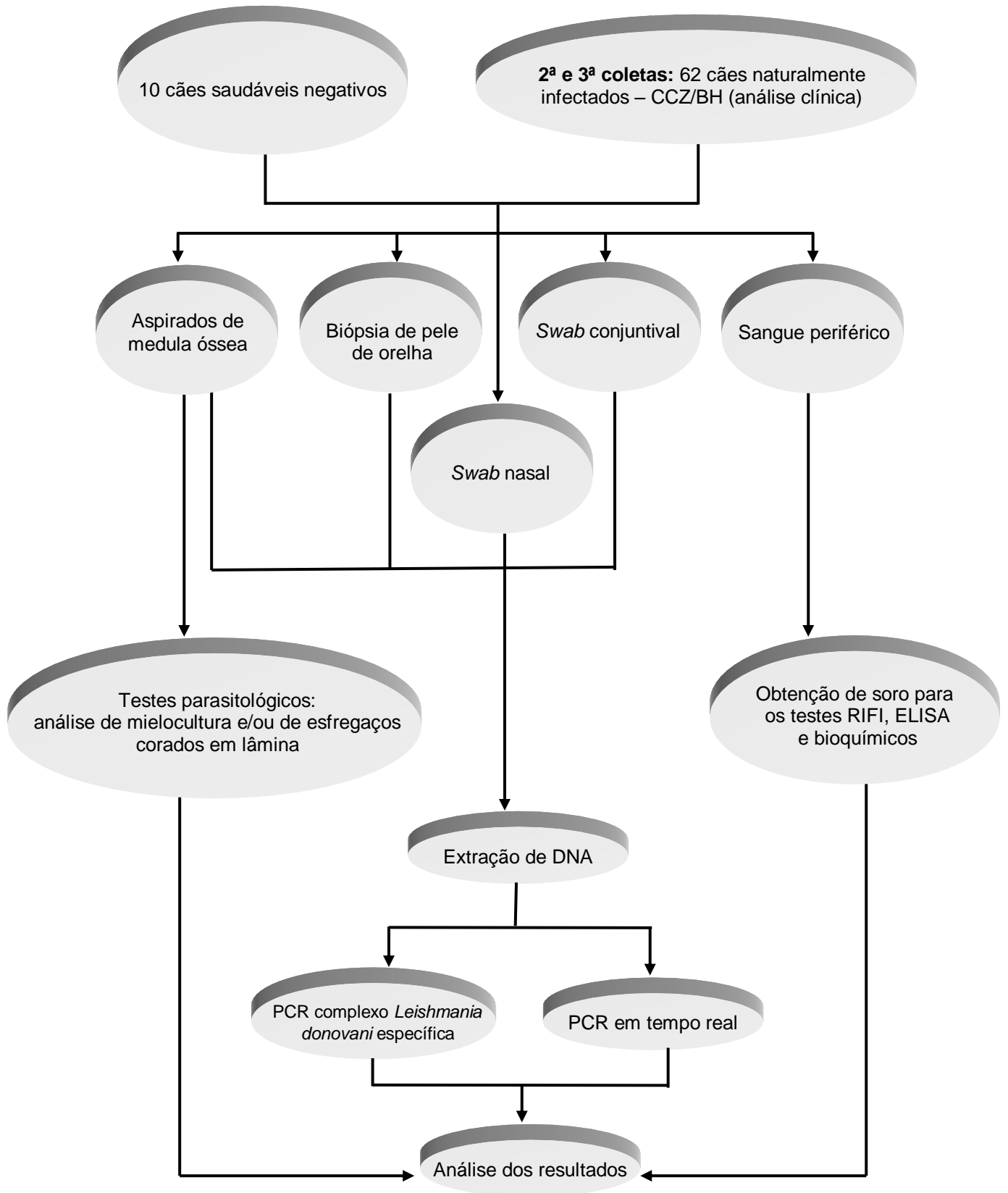


Figura 3: Delineamento experimental da etapa 2 (n = 62).

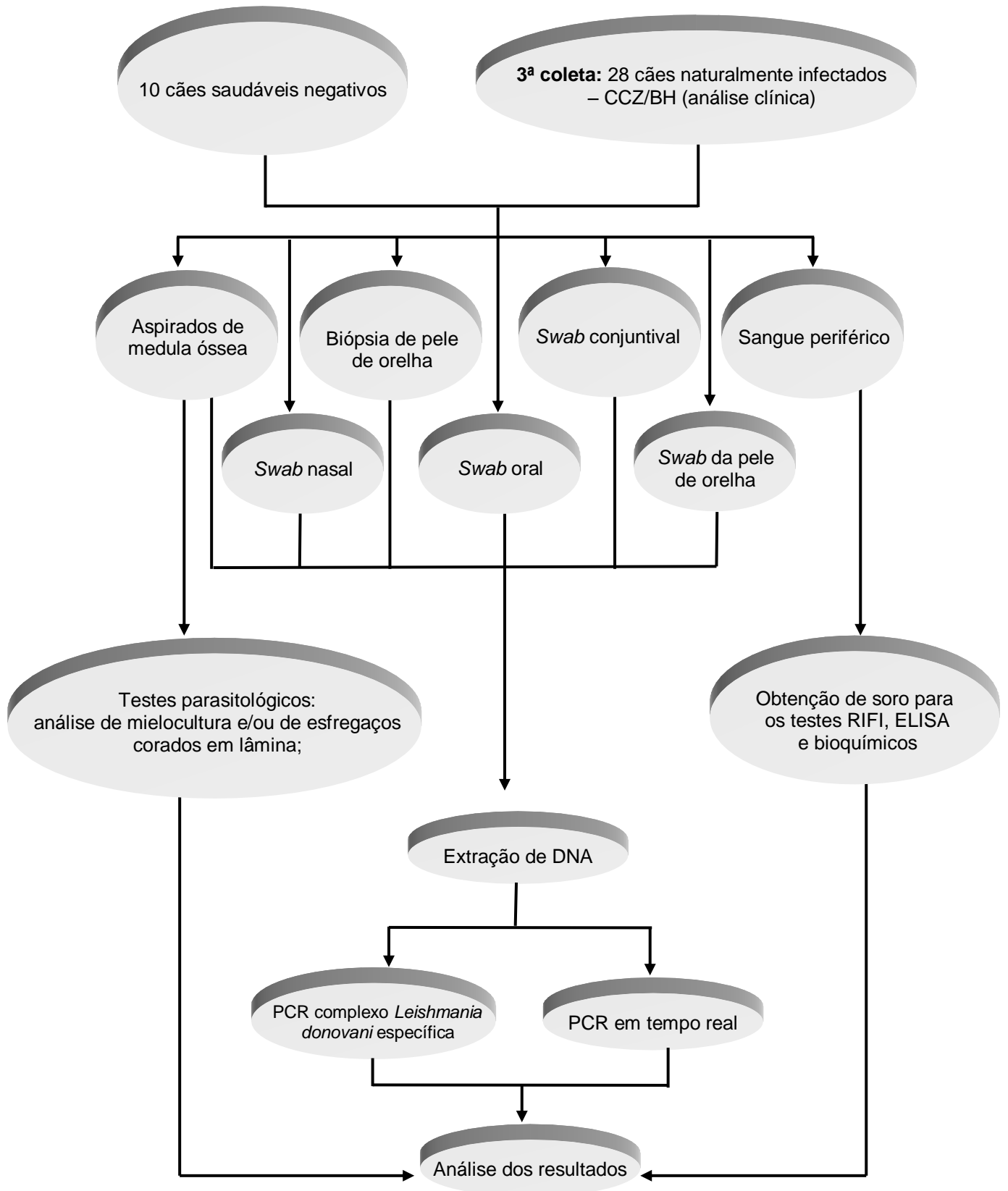


Figura 4: Delineamento experimental da etapa 3 (n = 28).

4.3) Coleta de amostras clínicas

4.3.1) Swab conjuntival

Antes dos processos de coleta, os cães foram sedados e anestesiados utilizando-se, respectivamente, Xilazina (Syntec, Brasil) a 2% (2,2mg/kg) e Tiopental sódico (Cristália, Brasil) a 2,5% (9,0mg/kg). Após isso, procedeu-se a coleta de todas as amostras clínicas.

Para as coletas não invasivas, foram utilizados *swabs* estéreis manufacturados para uso clínico-hospitalar (Inlab[®]). Na conjuntiva inferior de ambos os olhos de cada cão, esfregou-se um *swab* estéril para a coleta de células exfoliativas (Figura 5). As extremidades destes *swabs* foram separadas e acondicionadas em tubos tipo *ependorf* DNase e RNase *free* de 1,5mL. Estes foram armazenados em gelo e, logo após, foram mantidos a -20°C até seu processamento.

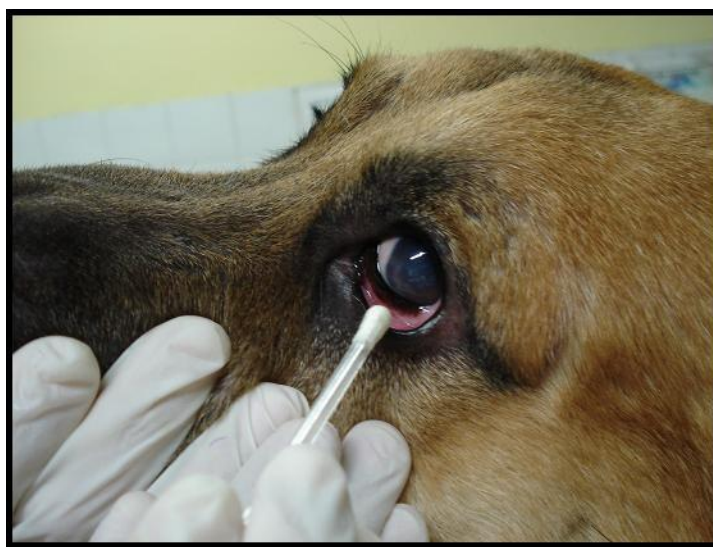


Figura 5: Coleta do *swab* conjuntival.

4.3.2) Swab nasal

Em cada narina dos cães, um *swab* estéril foi esfregado, separadamente, em movimentos circulares para a remoção de células da mucosa nasal (Figura 6). As extremidades dos *swabs* foram separadas e armazenadas conforme descrito para o *swab* conjuntival.



Figura 6: Coleta do *swab* nasal.

4.3.3) *Swab oral*

Um *swab* estéril foi atritado firmemente em movimentos circulares e de vai e vem na mucosa bucal de cada cão (Figura 7). O armazenamento deste material coletado foi feito como descrito para o *swab* conjuntival.



Figura 7: Coleta do *swab* oral.

4.3.4) Swab da pele de orelha

Previamente a esta coleta, a face interna da orelha esquerda de cada animal foi brevemente limpa com álcool 70% para remoção de impurezas mais grosseiras. Então, um *swab* estéril foi molhado em PBS (tampão de salina fosfatada) estéril e esfregado em movimentos circulares e de vai e vem na região mediana da face interna da orelha esquerda de cada cão (Figura 8). O armazenamento deste material foi realizado como descrito para o *swab* conjuntival.



Figura 8: Coleta do *swab* da pele de orelha.

4.3.5) Sangue periférico

Uma alíquota de sangue periférico de cada cão foi retirada, por punção da veia jugular, e armazenada em tubos de ensaio. Aproximadamente 1,0mL deste material foi transferido para tubos de 2,7mL de capacidade (Monovet, Sarsted, Alemanha) contendo Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA), os quais foram imediatamente mantidos em gelo e posteriormente destinados à extração de DNA. Um volume igual de sangue foi armazenado em tubos de ensaio idênticos aos anteriores, porém sem EDTA. Este último material foi mantido a temperatura ambiente e centrifugado a 415g por 15 minutos para obtenção do soro, o qual foi dividido em alíquotas, sendo estas estocadas a -20°C para a realização de testes sorológicos e bioquímicos (Figura 9).



Figura 9: Coleta de sangue periférico.

4.3.6) *Biópsia de pele de orelha*

As biópsias de pele foram realizadas na região interna da parte média da orelha direita de cada cão, utilizando-se *punches* estéreis de 5,0mm de diâmetro (Figura 10). O material retirado foi depositado em papel filtro estéril para remoção do excesso de sangue. Logo após, o material foi acondicionado em tubos *ependorf* DNase e RNase *free*, colocado em gelo e processado imediatamente após o término das coletas.



Figura 10: Biópsia de pele de orelha.

4.3.7) *Medula óssea*

Após discreta sedação dos cães, a região do esterno foi depilada com lâminas de barbear estéreis. Esta região foi submetida previamente a procedimento asséptico

utilizando-se polivinil pirrolidona iodo (Vansil, Brasil). Uma agulha de 40 gauges, acoplada a uma seringa de 10mL foi introduzida no esterno do cão para retirada de aproximadamente 1,0mL de medula óssea, o qual foi dividido em três frações (Figura 11). A primeira parte foi gotejada em uma lâmina de vidro (Invicta Brasil) previamente limpa e desengordurada. O esfregaço por extensão do material foi realizado com outra lâmina de vidro e estas foram secadas e armazenadas em temperatura ambiente. Cerca de 200 μ L do aspirado foram colocados em tubos eppendorf de 1,5mL DNase e RNase *free* e mantidos no gelo e a seguir, a -20°C para posterior extração de DNA. O material restante nas seringas foi transferido para tubos contendo meio de cultura para a realização de exames parasitológicos posteriores com mielocultura.



Figura 11: Coleta de medula óssea.

Após todas as coletas, o anestésico foi reaplicado em quantidade suficiente para a obtenção de parada cardíaca e respiratória nos cães.

4.4) Testes parasitológicos

Para verificação da presença do parasito, uma fração do aspirado medular foi adicionado ao meio de cultura bifásico NNN (Novy, McNeal e Nicolle) acrescido da fase líquida de meio α MEM (*Minimum Essential Medium*, Gibco BRL, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (CULTILAB, Brasil) e acrescido de estreptomicina a 1,0 μ g/mL e penicilina G potássica, a 100U/mL (GIBCO BRL, *Life Technologies*, EUA). O meio NNN foi feito utilizando-se sangue de coelho desfibrinado a 12%. Cada amostra foi dividida em duplicatas e colocada em dois tubos contendo o

meio de cultura. Estes tubos foram mantidos a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ em estufa biológica (FANEM, Brasil). A cada quinze dias, todas as culturas eram examinadas ao microscópio óptico e repicadas, por até três vezes, avaliando-se sempre o repique anterior, para verificar a presença e crescimento dos parasitos.

Os esfregaços feitos por extensão a partir dos aspirados medulares foram coradas utilizando-se o método Panótico Rápido[®], conforme as recomendações do fabricante (Bioclin do Brasil): após secagem em temperatura ambiente, as lâminas eram imersas por 20 segundos, sob discreta agitação em fixador, corante básico e corante ácido nessa ordem. Foram então lavadas em água corrente, secadas em temperatura ambiente e examinadas por microscopia óptica em objetiva de imersão.

4.5) Testes sorológicos

Os testes sorológicos de RIFI e ELISA foram realizados segundo os procedimentos padronizados no Laboratório Biologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia da UFMG. Os antígenos para ambas as técnicas foram obtidos de cultura de promastigotas de *L. infantum*, cepa MHOM/BR/1967/BH46.

4.5.1) ELISA

Após cinco dias de cultivo em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*), as promastigotas em fase logarítmica de crescimento foram lavadas três vezes em PBS (pH 7,4), centrifugadas a 250g por 10 min a 4°C . Em seguida, foram resuspendidas em PBS, submetidas à ruptura por ultrassom (BRANSON 1510[®], EUA) a 40 W e centrifugadas a 1360g por 10 minutos. A concentração do antígeno foi estimada utilizando-se o método de Lowry (Lowry et al. 1951). O antígeno foi então aliquotado e armazenado a -20°C até o momento de uso.

A detecção de anticorpos IgG anti*Leishmania* pelo método de ELISA nos soros obtidos foi feita segundo a técnica pré-estabelecida por Voller et al. (1976), com modificações. Foram utilizadas microplacas de polietileno para ELISA (INLAB, Brasil) de 96 orifícios e fundo plano. Cada orifício foi sensibilizado com $2\mu\text{g}$ de antígeno solúvel, diluídos em $100\mu\text{L}$ de tampão carbonato (Anexo 4), durante um período mínimo de 24 horas. Para a realização do teste, o excesso de antígeno foi retirado da placa pela lavagem de cada orifício por cinco vezes com solução de lavagem contendo

0,9% (p/v) de cloreto de sódio e 0,05% (v/v) de Tween 20[®]. A seguir, para bloqueio dos sítios inespecíficos, foram adicionados 150µL de solução de PBS-Caseína a 2% (p/v), (Sigma Aldrich, EUA) por orifício. A placa foi incubada por 30 minutos em estufa a 37°C. O excesso de solução de bloqueio foi então retirado por duas lavagens sucessivas. Em seguida, 100µL dos soros, diluídos em tampão de incubação e na razão de 1:400, foram aplicados em cada orifício e a placa novamente colocada em estufa a 37°C por 45 minutos. O excesso do soro diluído foi retirado logo após por uma série de cinco lavagens.

Foi utilizado como conjugado, anti-imunoglobulina IgG de cão, marcada com Peroxidase VI (*Bethyl Lab. Inc.*, EUA). Após ser diluído na razão de 1:10.000, 100µL do conjugado foi acrescentado a cada orifício, e a placa deixada em incubação por mais 45 minutos a 37°C. Posteriormente, esta solução foi retirada por nova série de cinco lavagens e em seguida, foram adicionados a cada orifício, 100µL de uma solução com o cromógeno OPD - Orto-Fenilenediamino dihidroclorido (Sigma Aldrich, EUA) em tampão fosfato-citrato (pH 5,0) e H₂O₂ (30 volumes), (Anexo 4).

A reação ocorreu em estufa a 37°C durante 10 minutos, e foi interrompida por adição de 25µL de H₂SO₄ a 4N (Merck, Alemanha). Em qualquer etapa, após as lavagens, as placas foram secadas por inversão sobre papel absorvente. A leitura foi efetuada em leitor de ELISA (*Bio-Rad 2550*[®], EUA), a 495nm. O ponto de corte ou “cut off” foi determinado pela média das absorbâncias de oito soros de cães não infectados originários de região não endêmica da doença, mais duas vezes o desvio padrão.

4.5.2) RIFI

Os parasitos foram obtidos em fase logarítmica de crescimento em meio LIT. Após três dias de cultivo, os parasitos foram fixados em formalina a 5% por 30 min e, logo após, lavados em PBS (pH 7,4), centrifugados a 250g por 10 min a 4°C. O sedimento foi resuspenso em igual solução e submetido a três centrifugações sucessivas nas mesmas condições explicitadas anteriormente. Em seguida, o sedimento foi resuspenso em PBS e uma gota foi colocada em lâmina sob lamínula (24 X 24 mm) para contagem de células utilizando-se microscopia óptica em objetiva de 40X. Após a determinação de 16 a 32 promastigotas por campo, 10µL da suspensão foram colocados em cada região demarcada de uma lâmina própria para imunofluorescência, a qual foi secada por ventilação artificial. Finalmente, as lâminas

foram envoltas com papel absorvente, revestidas com papel alumínio e conservadas a -20°C até o momento de uso.

Os soros dos animais candidatos ao experimento foram diluídos na razão dois, a partir de 1:40 até a diluição final, em solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4). Foram colocados 25µL da diluição obtida sobre cada região demarcada das lâminas com o antígeno fixado. Após a incubação das lâminas em câmara úmida por 30 minutos em estufa a 37°C, estas foram lavadas três vezes, por 5min com PBS, lavadas rapidamente em água destilada e secadas sob ventilação artificial. A cada região demarcada da lâmina foram acrescentados 25µL do conjugado diluído a seu título em PBS com Tween 2% (*Tween*[®] 20, Merck, Alemanha), acrescido de Azul de Evans 1% (*EVANS BLUE*[®], Sigma Aldrich, EUA) a 1:2000. O conjugado é constituído por anti-IgG de cão, marcado com Isotiocianato de Fluoresceína. As lâminas foram novamente incubadas por 30min a 37°C, lavadas e deixadas secar como descrito anteriormente. As lâminas foram então cobertas com glicerina tamponada, pH 7,4 e sobrepostas por uma lamínula, sendo a leitura realizada em microscópio de luz ultravioleta (*Olympus BX 41*[®], Japão). Soros conhecidamente positivos e negativos foram usados na mesma lâmina como controles da reação.

4.5.3) *Bioquímica sérica*

Os testes bioquímicos foram realizados com alíquotas previamente armazenadas dos soros de todos os cães. Para as determinações dos níveis de uréia, foi utilizado o teste enzimático colorimétrico (*Bioclin*[®]) e para as proteínas totais e albumina, foi utilizado o teste colorimétrico (*Bioclin*[®]) conforme instruções do fabricante. Os níveis séricos de globulinas foram obtidos pela subtração das medidas das proteínas totais pelas de albumina.

O teste para detecção de creatinina foi realizado no laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG. Os valores de referência adotados para a avaliação dos resultados dos parâmetros bioquímicos foram aqueles descritos por Latimer et al. (2003) e Kaneko et al. (1997).

4.6) Extração de DNA

As extremidades dos *swabs* foram submetidas ao processo de extração de DNA via fenol-clorofórmio. Este método foi realizado de acordo com Strauss-Ayali et al. (2004), com pequenas modificações. Uma mistura de 300µL de proteinase K (Sigma) (250µg/mL) e Triton X-100 a 1% em tampão de lise [Tris 50mM, NaCl 50mM e EDTA 10Mm (pH 8,0)] foi adicionada a tubos *ependorf* estéreis DNase e RNase *free* contendo os *swabs* e as amostras foram incubadas por 2h a 56°C. Para a precipitação protéica, o produto da lise foi transferido para tubos *Phase Lock Gel-Heavy* (PLG-H) (*Eppendorf*) contendo 500µL com 75% de fenol tris-saturado (Sigma) e 25% de clorofórmio – álcool isoamílico (24:1). A mistura foi centrifugada por 12000g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para novos tubos PLG-H. Este processo de precipitação protéica foi repetido duas vezes utilizando-se álcool-isoamílico a 50 e 100% respectivamente. Em seguida, o DNA foi precipitado em um volume de isopropanol acrescido de 50µL de acetato de sódio 3M, centrifugado a 12000g por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado. O DNA foi lavado com etanol 75%, deixado secar a 50°C por 20min e o precipitado foi suspenso em 30µL de água milliQ autoclavada. Para a extração de DNA do *swab* da pele de orelha, foi adotado o mesmo procedimento anterior com apenas uma modificação no tempo de incubação com o tampão de lise que, neste caso, foi de 16h.

O DNA foi purificado a partir do sangue periférico utilizando-se o kit *GE Healthcare*[®] *Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit* seguindo as instruções dos fabricantes. Primeiramente, cerca de 1,0mL de sangue periférico foi adicionado a 3,0mL de solução para lise de hemácias (RBC) [KHCO₃ a 10 mM, NH₄Cl a 155mM, e EDTA a 0,1mM (pH 8,0)]. As misturas foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugadas a 500g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi agitado em vórtex. Vinte microlitros de proteinase K a 20mg/mL foram adicionados em cada amostra. Quatrocentos microlitros de tampão de lise fornecido pelo kit foram transferidos para as amostras e estas foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos. A solução foi transferida para tubos contendo filtros, centrifugada por 1 minuto a 11000g, sendo o líquido residual descartado. Este mesmo procedimento foi repetido utilizando-se 500µL do mesmo tampão de lise, sendo o líquido resultante descartado após centrifugação por 11000g por 3 minutos. Finalmente, 100µL de eluente foram adicionados aos mesmos tubos, incubados a

temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugados por 11000g por 1 minuto para eluição do DNA.

Para a extração de DNA a partir de medula óssea, foi utilizado o mesmo protocolo anterior. Apenas o uso da solução RBC foi omitido. Neste caso, foram obtidos 100µL de solução final de DNA purificado.

As biópsias de pele foram submetidas ao protocolo de extração de DNA utilizando o kit da *Wizard® - SV Genomic DNA Purification System – Promega*, de acordo com as instruções dos fabricantes. Cada fragmento de pele foi mergulhado em 275µL em solução de lise fornecida, acrescida de 20µL de proteinase K a 20mg/mL, a qual foi incubada por 16 h a 55°C. Em seguida, 160µL de um segundo tampão de lise fornecido no kit foi adicionado às amostras, que foram misturadas utilizando-se vórtex. As soluções foram transferidas para tubos contendo filtros e centrifugadas por 3 minutos a 13000 g para ligação do DNA. O líquido residual foi descartado, o DNA foi lavado quatro vezes com 650µL de solução própria fornecida no kit e centrifugado a 13000g por 1 minuto. Após descartar o líquido residual, o DNA foi eluído com 160µL de água milliQ autoclavada.

As soluções finais de DNA de todas as amostras clínicas foram armazenadas a 4°C até o momento de uso.

4.7) PCR

O método de PCR para amplificação da região conservada dos minicírculos do kDNA de *Leishmania* sp., com 120 pares de base (pb), foi previamente descrito (Degraeve et al. 1994). Para sua realização, 1,0µL de cada amostra com DNA purificado foi adicionado a 24µL de uma solução contendo 2,5µL de dNTPs a 1,0mM, 200 ng de cada oligonucleotídeo iniciador [5'–(G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACAACCCC–3' e 5'GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA–3'], 2,5 unidades da Taq DNA polimerase (Ludwig Biotech®), 2,5µL de solução tampão (Tris-HCl 50mM, [pH 8,3]), KCl 50mM, 1,5µL de MgCl₂ a 3,0mM e um volume complementar de H₂O milliQ autoclavada. O mesmo foi feito para os controles negativos nos quais foi aplicado 1,0µL de H₂O milliQ autoclavada no lugar do DNA. O DNA extraído de células de um cão saudável sem infecção também foi utilizado como controle negativo da reação. Um marcador de massa molecular de 100pb foi utilizado como padrão de referência (Ludwig Biotec®).

Para os controles positivos, foram utilizados 1,0 μ L de solução contendo DNA genômico purificado de *L. infantum*, (cepa MHOM/BR/1973/BH46) e 1,0 μ L de solução contendo DNA genômico purificado de *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/1975/M2903), ambos na concentração de 1,0ng/ μ L. O mesmo volume da preparação de DNA obtido de um cão reconhecidamente positivo para LV também foi utilizado como controle positivo.

As condições para a reação foram: 95°C por 15 min para a desnaturação inicial, seguindo-se 30 ciclos de amplificação (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C e 30 segundos a 72°C). Foi feito ainda um passo para a extensão final a 72°C por 10 minutos. Depois disso, o sistema permaneceu a 4°C. O termociclador (Perkin Elmer®) foi programado para delinear todas essas etapas nas temperaturas e tempos determinados. As diferentes etapas da reação de PCR foram realizadas em laboratórios diferentes seguindo-se um fluxo unidirecional de trabalho para evitar contaminações. Os produtos da PCR foram previamente analisados em gel de agarose.

4.8) Eletroforese em gel de agarose

Para analisar os produtos de PCR, 5,0 μ L de tampão de amostra (Tris 10 mM, EDTA 10mM, azul de bromofenol 0,005% m/v e glicerol 10% v/v) foram acrescentados a 10 μ L de cada produto da reação que, em seguida, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, com brometo de etídio a 1,0 μ g/ μ L, numa diferença de potencial de 90V. Um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pb (Ludwig Biotech®) foi utilizado e a corrida foi realizada em tampão Tris borato EDTA 1X.

4.9) Dot Blot

Dez microlitros dos produtos de PCR foram aquecidos a 100°C por 5 minutos e resfriados imediatamente em gelo. A eles foram acrescentados 11 μ L de solução desnaturante [NaOH 0,4N, EDTA 25mM (pH 8,0)]. Em seguida, as amostras foram aplicadas, sob vácuo, a uma membrana de nylon utilizando-se o aparelho *Bio Dot (Hybri-dot Manifold - BRL®)*. Cada poço recebeu mais 100 μ L da solução desnaturante e o aparelho foi submetido novamente ao vácuo. A membrana foi lavada com SSC 2X (NaCl 0,3M, citrato de sódio, 0,3mM), deixada secar sobre papel filtro e submetida a luz ultravioleta no aparelho *Stratalinker* (BioRad) para fixação do DNA (0,12J/cm²).

4.10) Hibridização

Foram utilizados como sondas mini-círculos clonados de *L. infantum* e de *L. braziliensis*. Estas foram marcadas com $^{32}\text{P}[\alpha]\text{dCTP}$ utilizando-se o método dos iniciadores aleatórios (Invitrogen[®]). As condições de hibridização foram previamente descritas por Andrade et al. (2001). A membrana de nylon, contendo as amostras, foi pré-incubada a 58°C por 30 minutos em solução de leite desnatado 0,5%, sulfato dodecil de sódio (SDS) 1% e SSC 2X. A solução foi trocada utilizando-se um volume suficiente apenas para cobrir a membrana. As sondas marcadas foram adicionadas à solução, após terem sido previamente aquecidas por 3 minutos a 100°C. As membranas foram incubadas por 14h a 58°C com agitação e depois lavadas em solução SSC 0,5X, SDS 0,5% a 65°C por 30 minutos. A membrana foi deixada secar a temperatura ambiente. Finalmente, ela foi exposta ao cassete BAS 2325 (Fujifilm[®]) por 2h. A imagem foi obtida através do analisador de imagem *Bio-Imaging Analyzer* (Fujifilm[®]). As mesmas membranas foram incubadas em solução de NaOH 0,4N por 1 hora a 42°C por duas vezes para remoção das sondas. Então, outro processo de hibridização foi repetido com sondas de *L. braziliensis* seguindo o mesmo protocolo adotado para as sondas de *L. infantum*.

4.11) PCR complexo *Leishmania donovani* específica

A PCR complexo *L. donovani* específica (cPCR), conforme descrito por Piarroux et al. (1993), foi realizada para as preparações de DNA dos cães das segunda e terceira etapas deste estudo. O volume de 1,0µL de cada preparação de DNA foi adicionado a uma solução de 9µL contendo 5,0µL de uma mistura padronizada de reagentes (Master Mix Go Taq[®] - Promega), 1,0pmol de cada iniciador [5' ACG AGG TCA GCT CCA CTC C 3'], [5' CTG CAA CGC CTG TGT CTA CG 3'] e um volume complementar de H₂O milliQ autoclavada. Os iniciadores desta reação são endereçados para a região conservada de minicírculos de kDNA das espécies de *Leishmania* pertencentes ao complexo *L. donovani* e permitem a amplificação de um fragmento de 100pb. Os controles positivos e negativos foram os mesmos descritos no tópico 4.7, exceto o controle para *L. braziliensis*.

Um termociclador (Perkin Elmer®) foi utilizado para programar as seguintes etapas de termociclagem: 96°C por 5min, 35 ciclos (94°C por 30s, 59°C por 30s, 72°C por 30s), 72°C por 2min e logo após, o sistema permaneceu a 4°C. As diferentes etapas da reação foram realizadas em laboratórios distintos seguindo-se um fluxo unidirecional de trabalho para evitar contaminações. Os produtos da cPCR foram analisados em géis de poliacrilamida.

4.12) Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos da cPCR foram analisados em gel de poliacrilamida não desnaturante a 5%, corado com nitrato de prata (Sambrook et al. 1982). Um marcador de massa molecular de 100pb foi utilizado como padrão de referência (Promega, EUA). Três microlitros de cada produto da cPCR dissolvidos em tampão de amostra (tópico 4.8) foram aplicados no gel. A corrida eletroforética foi realizada a 80 – 100V por cerca de 1 hora. Após a corrida, os géis foram colocados em solução fixadora (etanol absoluto a 10% e ácido acético glacial a 0,5%) durante 10min sob leve agitação. Em seguida, os géis foram transferidos para uma solução de nitrato de prata a 0,1% com a qual permaneceram sob suave agitação por 10min. Após isso, os géis foram rapidamente lavados com água deionizada por duas vezes e mergulhados em solução reveladora (NaOH a 3% [p/v] e formaldeído a 0,3%) até a clara visualização das bandas. Uma vez completa a revelação, os géis foram novamente lavados com água deionizada, colocados em solução fixadora e fotografados para documentação.

4.13) PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) foi realizada para a quantificação absoluta da carga parasitária conforme descrito anteriormente (Murta et al. 2006, Alves et al. 2009b) com pequenas modificações. As reações foram realizadas utilizando-se iniciadores endereçados para o gene da DNA polimerase de *L. infantum* de 90 pb (acesso no *GenBank*: AF009147): [5' TGT CGC TTG CAG ACC AGA TG 3'] e [5' GCA TCG CAG GTG TGA GCA C 3']. Também foram utilizados iniciadores cujo alvo é o gene constitutivo de β -actina de *Canis familiaris* com 307 pb (acesso no *GenBank*: NM_001195845.1): [5' CTT CTA CAA CGA GCT GCG CG 3'] e [5' TCA TGA GGT AGT CGG TCA GG 3'].

4.13.1) Construção das curvas-padrão

Para a construção das curvas-padrão, foram utilizados plasmídeos TOPO PCR 2.1 (Invitrogen) contendo, separadamente, insertos de cada gene alvo de amplificação. Estes genes foram previamente clonados, purificados e sequenciados pela equipe de nosso laboratório (Alves et al. 2009b). Estes vetores foram dosados por espectrofotometria (Epoch, Biotek, EUA) a 260 e 280nm para a obtenção da concentração do DNA em ng/ μ L. Considerando-se que 660pg (=0,66ng) corresponde, em média, a 1,0pmol (=10⁻¹²mol) de um par de nucleotídeo (Harden et al. 2004), é possível calcular, em nanogramas, a massa de um mol de um par de nucleotídeos pela seguinte expressão:

$$\frac{0,66\text{ng}}{10^{-12}\text{mol}} \times 1,0\text{mol} = 6,6 \times 10^{11} \text{ ng}$$

A partir disso, o número de moléculas ou cópias de DNA por microlitro de amostra foi calculado com base na expressão matemática abaixo:

$$\frac{6,02 \times 10^{23} \text{ moléculas}}{6,6 \times 10^{11} \text{ ng} \times N} \times Y \text{ ng}/\mu\text{L} = \text{Número de moléculas ou cópias}/\mu\text{L}$$

Em que:

- 6,02x10²³ corresponde ao número de Avogadro (= 1,0mol);
- 6,6x10¹¹ng corresponde à massa média de 1,0 mol de um par de nucleotídeos de DNA;
- N é o número conhecido de nucleotídeos presentes no plasmídeo + inserto;
- Y é a concentração de DNA, em ng/ μ L, obtida por espectrofotometria.

A partir do valor conhecido do número de cópias por microlitro, as amostras contendo os genes alvos de amplificação foram diluídas sucessivamente. Para a construção das curvas-padrão, foram utilizados seis pontos: 10⁷ a 10² moléculas para o

gene da DNA polimerase e 10^9 a 10^4 moléculas para o gene da β -actina. Em cada placa, as reações foram realizadas em duplicata.

4.13.2) Reação da PCR em tempo real

As reações foram realizadas em placas de 96 poços *MicroAmp*[®] *Optical 96 Well Reaction Plate* cobertas com adesivo ópticos (Applied Biosystems) e processadas no aparelho *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems).

As curvas-padrão foram adotadas como controles positivos. Dois poços para cada gene alvo receberam água milliQ autoclavada no lugar de DNA e funcionaram como controles negativos. As etapas de termociclagem foram: desnaturação inicial a 95°C por 15min seguida de 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min. No final, a temperatura foi gradualmente elevada até a dissociação completa do material amplificado para a obtenção da curva de dissociação (curva de *melting*).

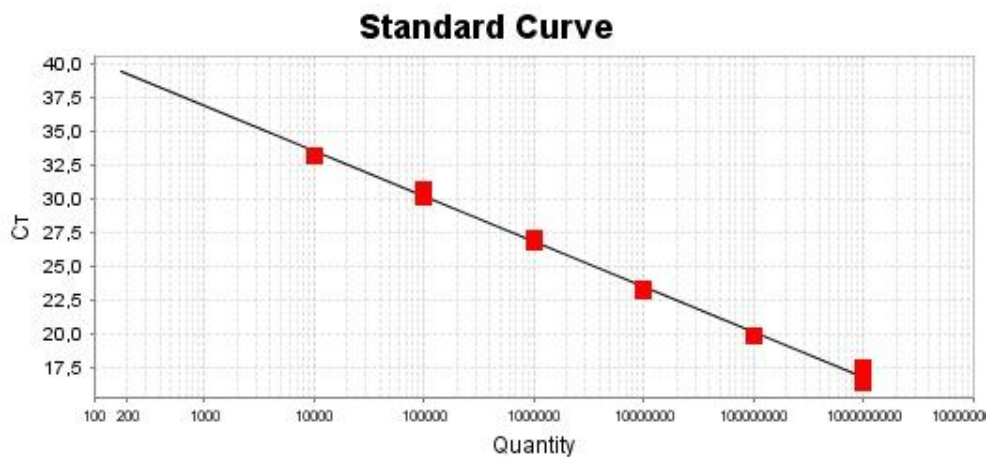
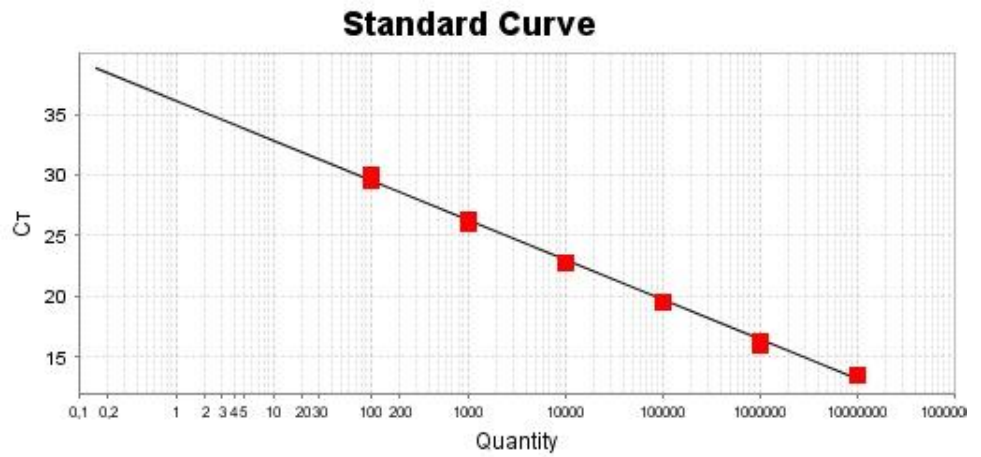
As reações foram realizadas num volume final de 10 μ L contendo 20ng de DNA, 5,0 μ L de SYBR GREEN *master mix 2X* (Applied Biosystems), 1,0 μ L de cada iniciador na concentração de 2,0pmol/ μ L para DNA polimerase ou 1,67pmol/ μ L para β -actina.

Para a quantificação do número de moléculas, o programa *Sequence Detection System* determinou, em cada amostra, o número de ciclos em que a fluorescência ultrapassava um limiar arbitrário ou *cycle threshold* (Ct). O número de cópias de cada gene amplificado foi estimado a partir de uma regressão linear utilizando-se os valores de Ct obtidos das respectivas curvas-padrão geradas com quantidades conhecidas do plasmídeo com os insertos de interesse. Para cada amostra, o número de cópias calculado do gene DNA polimerase foi dividido pela quantidade de cópias do gene da β -actina canina. Assumindo que estes genes são de cópia única, a expressão do resultado final da carga parasitária foi o número de parasitos por célula de cão. Normalmente, a quantidade de DNA canino é muito superior à quantidade de DNA de *Leishmania* nas amostras clínicas. Portanto, por questões didáticas, o resultado da carga parasitária foi expresso como número de parasitos por 10000 células caninas. Além disso, este gene constitutivo de cão foi utilizado para verificar a integridade do DNA extraído.

A técnica de qPCR foi então padronizada a partir das curvas-padrão incluindo os dois genes alvo de interesse. Os dados referentes a essa padronização são demonstrados na Tabela 1 e na Figura 12.

Tabela 1: Medidas de eficiência, r^2 e inclinação da reta para as curvas padrão de cada gene alvo de amplificação.

<i>Gene alvo</i>	<i>Eficiência</i>	r^2	<i>Inclinação da reta</i>
DNA polimerase	99,1%	0,998	-3,31
β -actina	97,3%	0,998	-3,39

**Figura 12:** Curvas-padrão obtidas com quantidades conhecidas de cópias gênicas de DNA polimerase (A) e β -actina (B). As quantidades do gene de DNA polimerase variaram de 10^2 a 10^7 cópias e do gene de β -actina, de 10^4 a 10^9 cópias.

Com base nesta padronização, as cargas parasitárias puderam ser estimadas.

4.14) Análise estatística

As frequências de resultados positivos obtidas dos ensaios de PCR-hibridização ou cPCR para cada amostra clínica foram comparadas duas a duas dentro de cada grupo de cães. Estes resultados também foram comparados dois a dois entre os grupos, pareando-se sempre amostras clínicas do mesmo tipo. Todas estas comparações foram feitas mediante análise com o teste Qui-quadrado de Pearson para amostras maiores do que 30. Para tamanhos amostrais menores do que 30, foi utilizado o teste exato de Fisher. As distribuições dos dados passaram por análise de normalidade utilizando-se os testes de Kolmogorov-Smirnov e Dagostino-Pearson. Para as distribuições não paramétricas, foram utilizados os testes de Mann-Whitney para a análise entre dois grupos ou de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para a análise de três grupos. Alternativamente, para as distribuições normais, foram utilizados o teste t não pareado ou ANOVA em uma via seguido do teste de Tukey. Para análise de associação, foi adotada a correlação de Spearman. O nível de significância adotado foi de 5% de modo que os resultados foram considerados significativos para valores de $p < 0,05$.

Os cálculos para análise de frequências e obtenção das medidas de sensibilidade e especificidade foram realizados com o programa *Winpepi* (PEPI para Windows®). Para isso, foram utilizadas tabelas 2 X 2 e o teste parasitológico de mieloculturas foi utilizado como padrão ouro para obtenção das medidas de acurácia citadas. Para os demais cálculos, o programa *GraphPad Prism 5.0*. foi utilizado.

RESULTADOS

5) RESULTADOS

5.1) Grupo controle negativo

Todos os cães saudáveis pertencentes ao grupo controle negativo foram submetidos aos mesmos testes diagnósticos sorológicos, parasitológicos de mielocultura e PCR utilizados para os cães infectados. Todos os animais do grupo controle apresentaram resultados negativos para todos estes métodos. Além disso, os resultados dos testes de bioquímica sérica destes cães foram considerados normais segundo os critérios de Kaneko et al. (1997) e Latimer et al. (2003).

5.2) Resultados da parte 1: avaliação do *swab* conjuntival para o diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral Canina

5.2.1) Bioquímica sérica – parte 1

Os níveis séricos de creatinina aferidos nos cães sem sinais clínicos foram significativamente inferiores àqueles apresentados pelos cães com sinais clínicos ($p < 0,0001$) e equivalentes às medidas do grupo controle ($p > 0,05$), (Figura 13A). Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os níveis séricos de uréia dos cães naturalmente infectados e dos cães do grupo controle ($p > 0,05$), (Figura 13B). Em relação à albumina, os cães sem sinais clínicos apresentaram níveis séricos estatisticamente compatíveis aos do grupo controle ($p > 0,05$) e superiores aos dos cães com sinais clínicos. Estes últimos demonstraram níveis de albumina significativamente inferiores aos do grupo controle ($p = 0,0005$), (Figura 13C). Os dois grupos de animais infectados demonstraram níveis de globulina estatisticamente superiores aos níveis do grupo controle ($p = 0,0002$), (Figura 13D). A razão albumina/globulina do grupo de cães sem expressão clínica foi significativamente superior àquela apresentada nos cães com expressão clínica, mas foi inferior em relação à razão obtida no grupo controle ($p < 0,0001$) (Figura 13E).

5.2.2) Sorologia – parte 1

Em relação aos testes sorológicos realizados nos laboratórios de Sorologia e de Biologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, apenas 2 cães sem sinais clínicos para LVC tiveram resultado negativo para ELISA e RIFI, e 1

cão deste grupo apresentou resultado negativo apenas para ELISA. Somente 1 animal com sinais clínicos da LVC teve resultado negativo para RIFI. Todos estes cães com algum resultado negativo para a sorologia apresentaram positividade na mielocultura e foram incluídos no estudo.

Os valores de absorbância obtidos do imunoenensaio de ELISA foram estatisticamente equivalentes entre si ($p > 0,05$) e superiores aos do grupo controle ($p < 0,0001$) (Figura 14). Os títulos de anticorpos obtidos nos ensaios de RIFI variaram de 1:40 a 1:2.560 no grupo de cães sem expressão clínica enquanto que nos cães com sinais clínicos, a variação observada foi de 1:160 até 1:10.240. Os títulos de anticorpos obtidos em cada um destes grupos foram estatisticamente diferentes entre si ($p = 0,025$) (Figura 15).

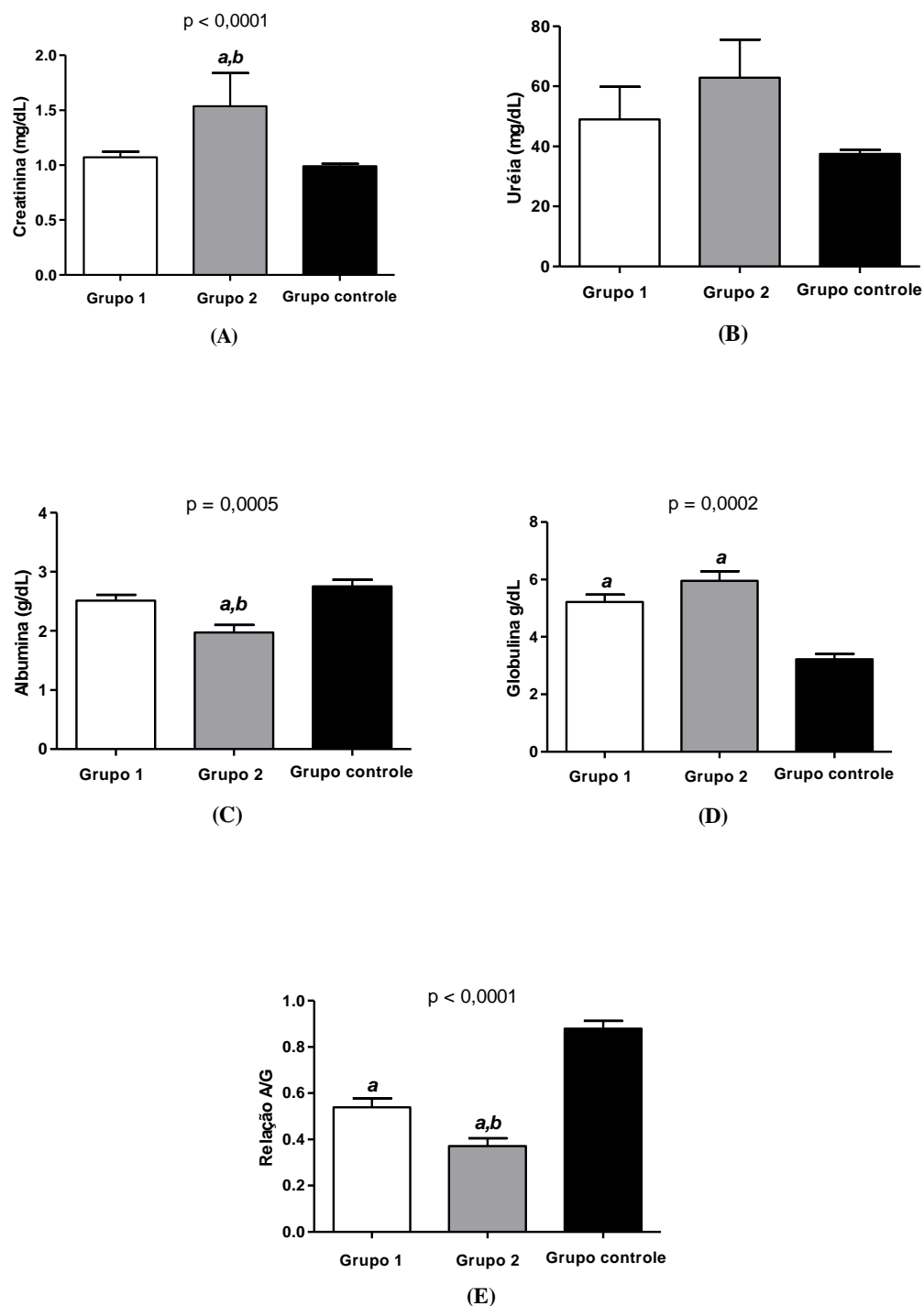


Figura 13: Parâmetros bioquímicos obtidos de cães com e sem sinais clínicos para a LVC naturalmente infectados por *L. infantum*. (A): creatinina, (B): uréia, (C): albumina, (D): globulina, (E): relação albumina/globulina (A/G). Grupo 1: 40 cães sem sinais clínicos naturalmente infectados por *L. infantum*; Grupo 2: 40 cães com sinais clínicos naturalmente infectados por *L. infantum*. Grupo controle: cães saudáveis não infectados. *a*: O grupo difere do grupo controle segundo o teste ANOVA seguido do teste de Tukey; *b*: O grupo difere do grupo 1 segundo o teste ANOVA seguido do teste de Tukey.

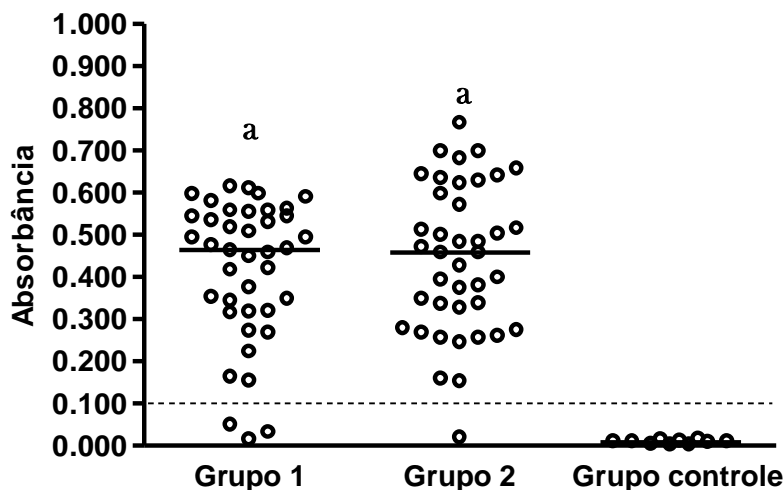


Figura 14: Medidas de absorbância obtidas do imunoenensaio de ELISA para cães sem sinais clínicos (Grupo 1) e com sinais clínicos para LVC (Grupo 2) naturalmente infectados por *L. infantum*. O ponto de corte (= 0,100) está representado pela linha pontilhada. **a:** O grupo difere apenas do grupo controle pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn ($p < 0,0001$).

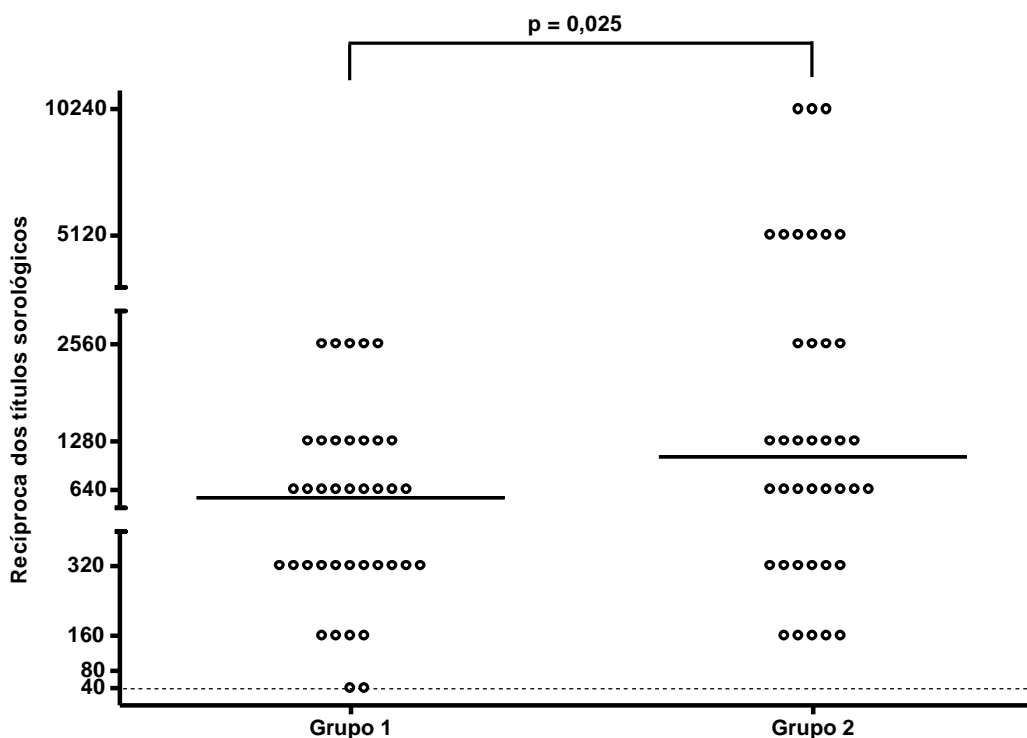
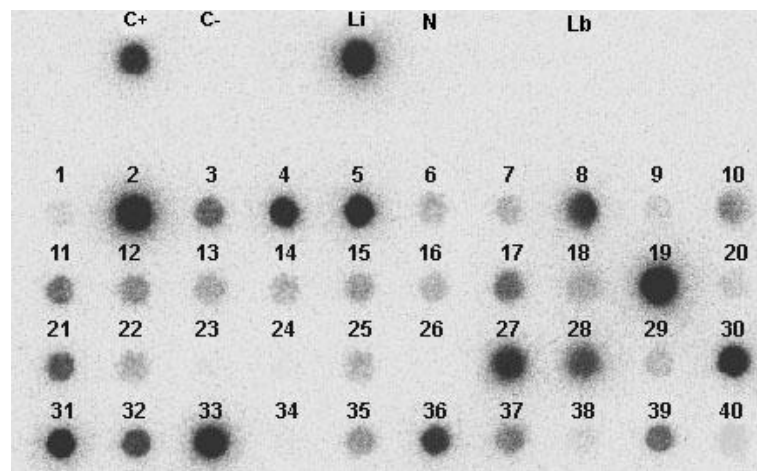


Figura 15: Recíproca dos títulos de IgG total obtidos em cães naturalmente infectados sem sinais clínicos (Grupo 1) e com sinais clínicos para LV (Grupo 2) naturalmente infectados por *L. infantum*. O ponto de corte (= 1:40) está representado pela linha pontilhada. Os grupos diferem entre si segundo o teste de Mann Whitney.

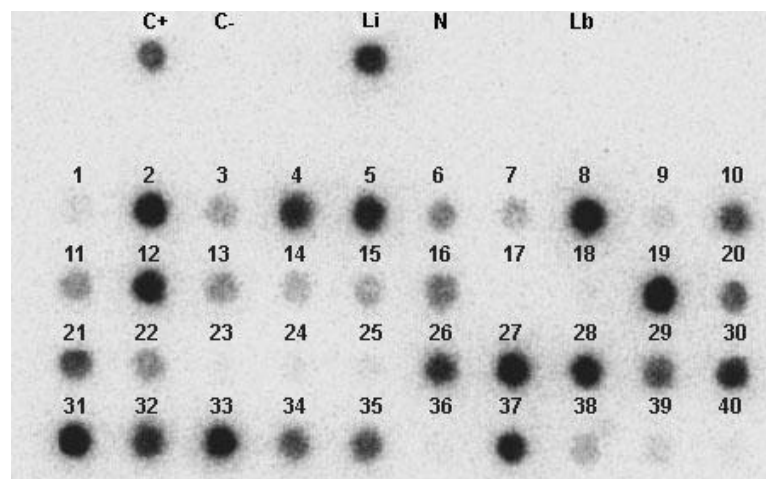
5.2.3) PCR-hibridização - grupo 1

Primeiramente, a frequência de resultados positivos para o *swab* conjuntival foi calculada separadamente para as conjuntivas direita e esquerda de cada animal, sendo estas consideradas amostras distintas. Após isso, todas as amostras clínicas foram comparadas entre si dentro de cada grupo.

Nos cães do grupo 1, as positivities obtidas por PCR-hibridização foram: 77,5% (31/40) para conjuntiva direita; 75% (30/40) para conjuntiva esquerda; 45% (18/40) para pele de orelha; 50% (20/40) para medula óssea e 27,5% (11/40) para sangue periférico. As Figuras 16 e 17 mostram as membranas de hibridização representativas para cada tipo de amostra clínica dos cães sem sinais clínicos para LVC.

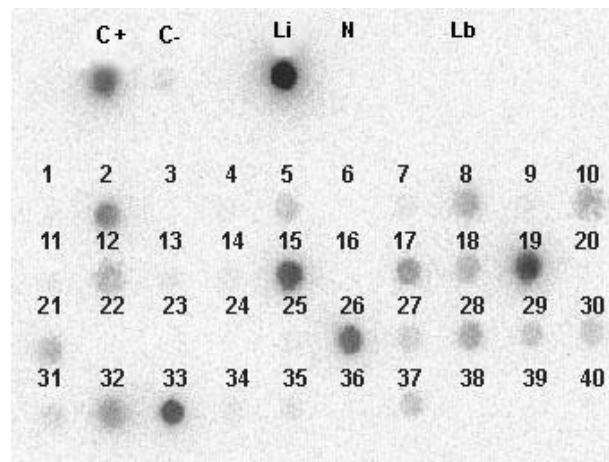


(A)

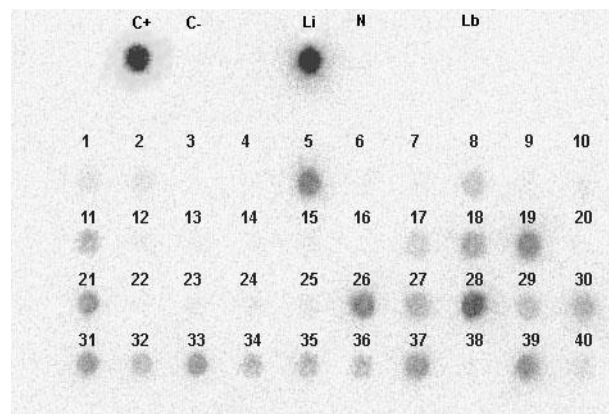


(B)

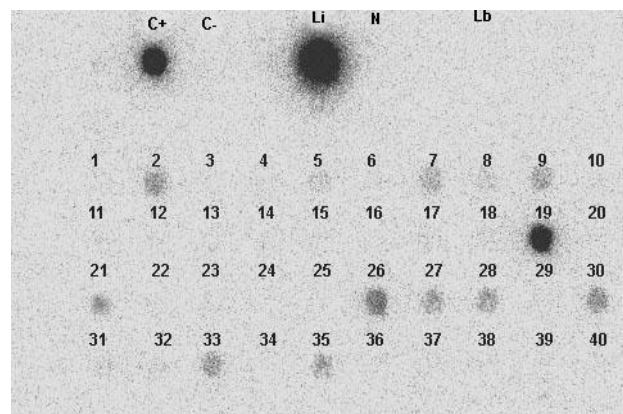
Figura 16: Resultados da hibridização, com sondas de *L. infantum*, dos produtos de PCR obtidos de *swab* conjuntival de cães sem sinais clínicos para LV (Grupo 1). **(A):** Conjuntiva direita; **(B):** Conjuntiva esquerda. **C+:** controle positivo de cão comprovadamente infectado por *L. infantum*; **C-:** controle negativo de cão saudável não infectado; **Li:** controle positivo para *L. infantum* (cepa MHOM/BR/1973/BH46); **N:** controle negativo sem DNA; **Lb:** controle positivo para *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/1975/M2903); **1-40:** amostras de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.



(A)



(B)



(C)

Figura 17: Resultados da hibridização, com sondas de *L. infantum*, dos produtos de PCR obtidos de amostras clínicas de coleta invasiva de cães sem sinais clínicos para LV (Grupo 1). (A): Pele de orelha; (B): Medula óssea; (C): Sangue periférico. C+: controle positivo de cão comprovadamente infectado por *L. infantum*; C-: controle negativo de cão saudável não infectado; Li: controle positivo para *L. infantum* (cepa MHOM/BR/1973/BH46); N: controle negativo sem DNA; Lb: controle positivo para *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/1975/M2903); 1-40: amostras de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

As frequências de positividade calculadas para os cães sem sinais clínicos para LV são mostradas na Tabela 2. Foi verificado que as positivities obtidas tanto da conjuntiva direita quanto da esquerda foram significativamente maiores do que aquelas obtidas das amostras clínicas de coleta invasiva ($p < 0,05$) (Tabela 2).

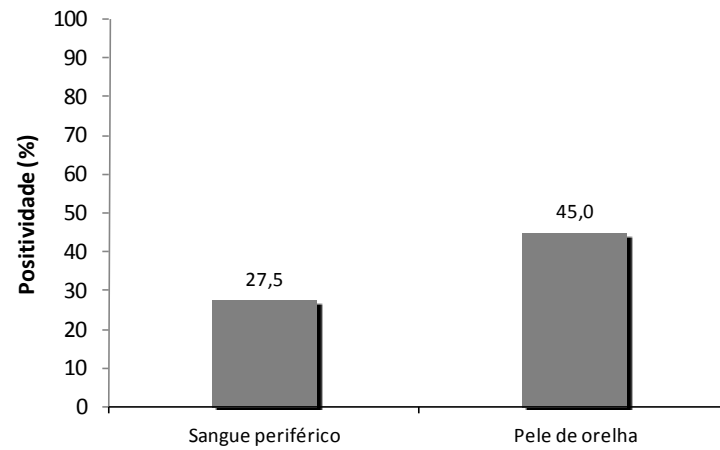
Também foi demonstrado que os resultados positivos obtidos da pele de orelha não foram estatisticamente diferentes dos resultados de medula óssea e de sangue periférico ($p > 0,05$). Por outro lado, o índice de positividade para medula óssea foi significativamente diferente daquele obtido para o sangue periférico ($p = 0,039$) (Figura 18).

Tabela 2

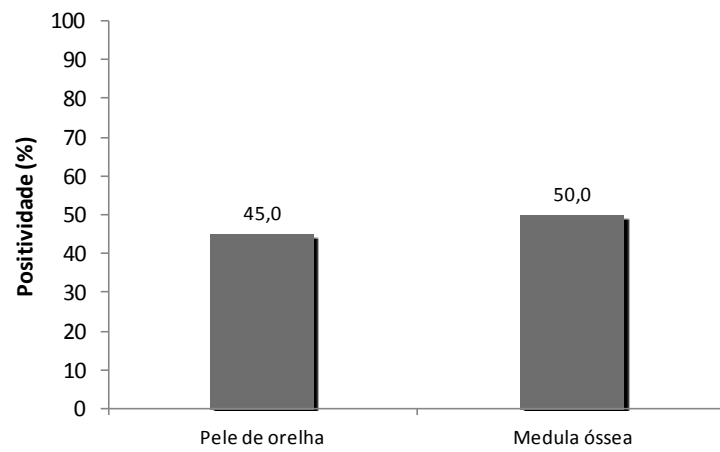
Comparação entre amostras clínicas de coleta invasiva e não invasiva segundo as frequências de positividade obtidas por PCR seguida de hibridização em cães sem sinais clínicos para LVC naturalmente infectados por *L. infantum* (Grupo 1).

<i>Positividade/amostra</i>	<i>Positividade/amostra</i>	
	Conjuntiva direita 31/40 (77,5%)	Conjuntiva esquerda 30/40 (75%)
Pele de orelha 18/40 (45%)	$p = 0,003$	$p = 0,006$
Medula óssea 20/40 (50%)	$p = 0,011$	$p = 0,021$
Sangue periférico 11/40 (27,5%)	$p < 0,001$	$p < 0,001$

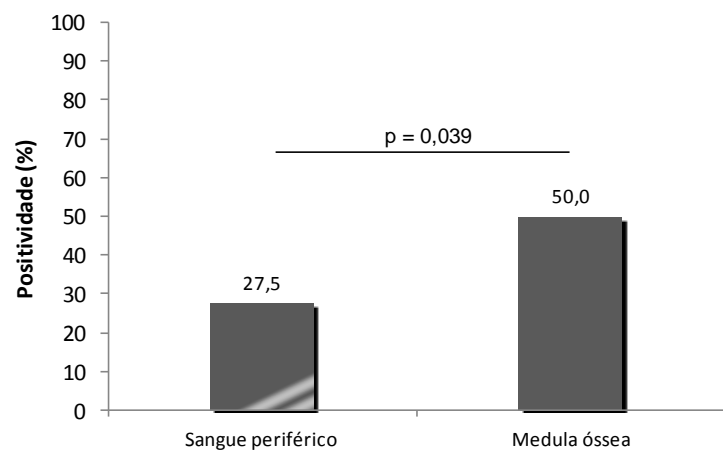
Os valores de p foram calculados utilizando-se o teste de qui-quadrado.



(A)



(B)

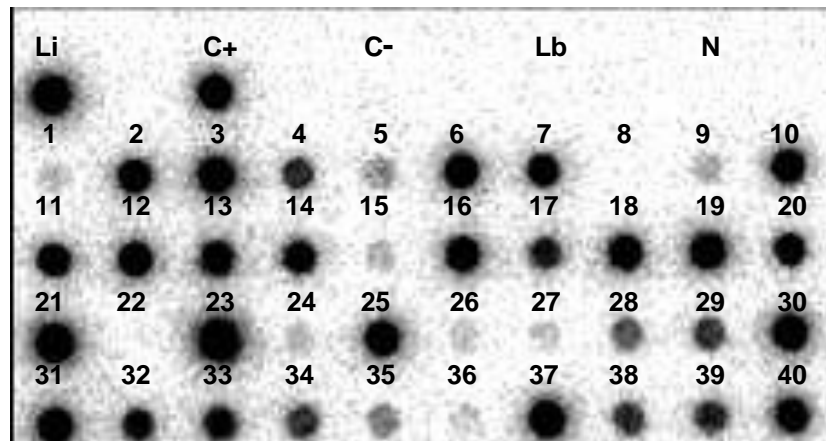


(C)

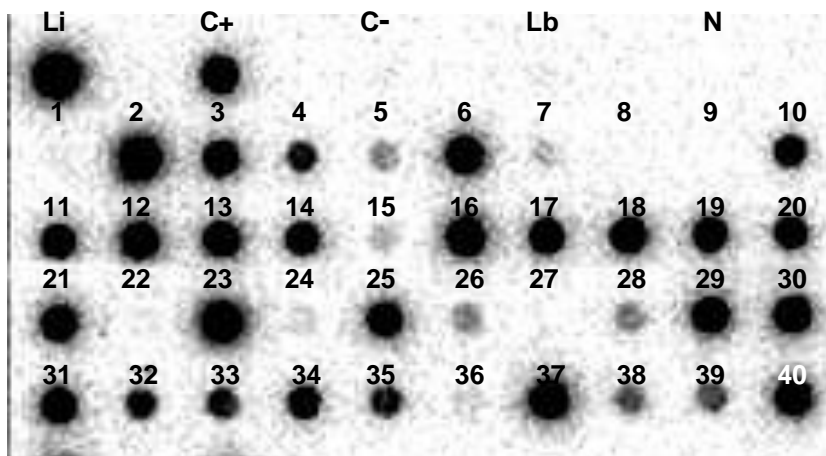
Figura 18: Positividades de PCR-hibridização obtidas de amostras clínicas de coleta invasiva em 40 cães sem sinais clínicos para LVC naturalmente infectados por *L. infantum* (Grupo 1). (A): Sangue periférico e Pele de orelha; (B): Pele de orelha e Medula óssea; (C): Sangue periférico e Medula óssea. O valor de p foi calculado utilizando-se o teste de qui-quadrado.

5.2.4) PCR-hibridização – grupo 2

Os resultados positivos de PCR-hibridização utilizando-se sonda de *L. infantum* para os cães do grupo 2 foram: 95% (38/40) para conjuntiva direita, 87,5% (35/40) para a esquerda, 75% (30/40) para pele de orelha, 77,5% (31/40) para medula óssea e 22,5% (9/40) para sangue periférico (Figuras 19 e 20).

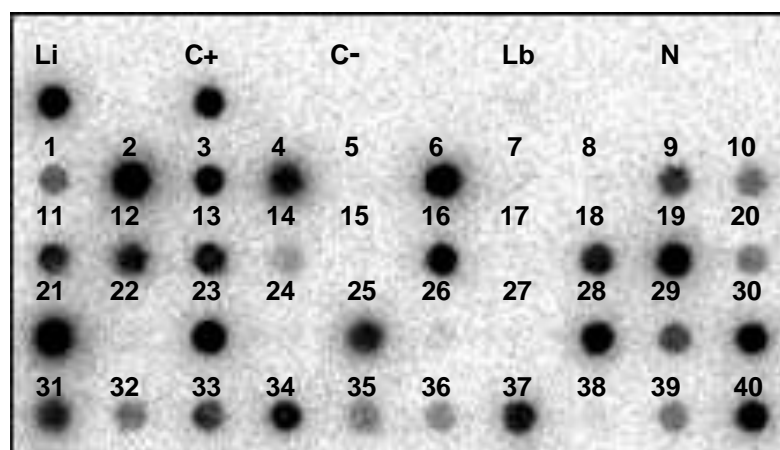


(A)

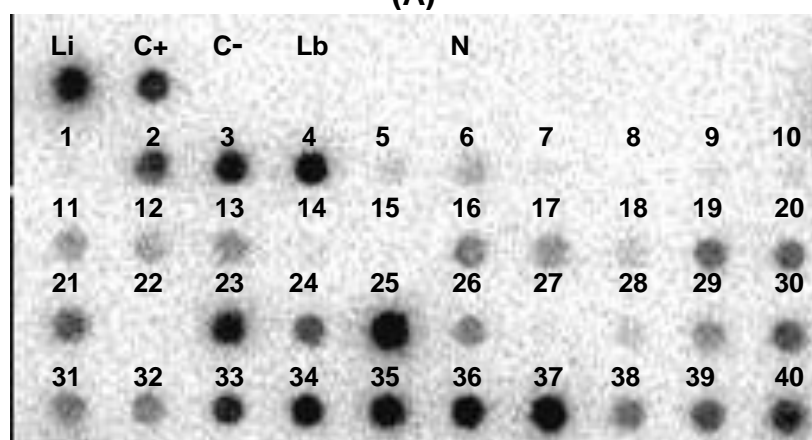


(B)

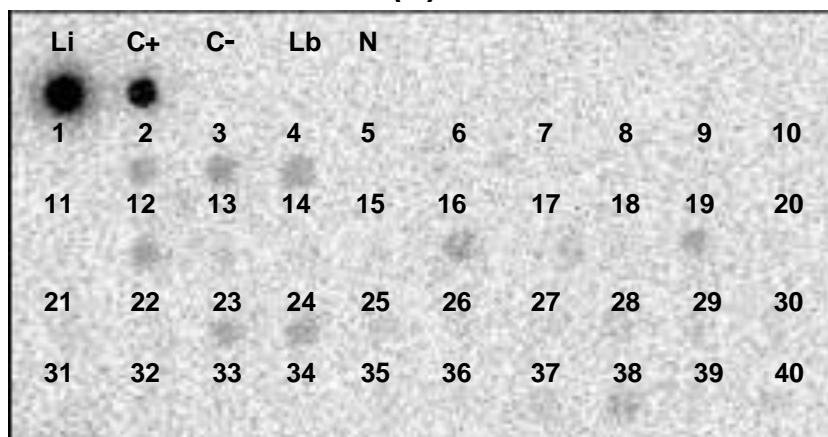
Figura 19: Resultados da hibridização, com sondas de *L. infantum*, dos produtos de PCR obtidos de swab conjuntival de cães com sinais clínicos para LV (Grupo 2). (A): Conjuntiva direita; (B): Conjuntiva esquerda. **Li:** controle positivo para *L. infantum* (cepa MHOM/BR/1973/BH46); **C+:** controle positivo de cão comprovadamente infectado por *L. infantum*; **C-:** controle negativo de cão saudável não infectado; **Lb:** controle positivo para *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/1975/M2903); **N:** controle negativo sem DNA; **1-40:** amostras de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.



(A)



(B)



(C)

Figura 20: Resultados da hibridização, com sondas de *L. infantum*, dos produtos de PCR obtidos de amostras clínicas de coleta invasiva de cães com sinais clínicos para LV (Grupo 2). (A): Pele de orelha; (B): Medula óssea; (C): Sangue periférico. **Li:** controle positivo para *L. infantum* (cepa MHOM/BR/1973/BH46); **C+:** controle positivo de cão comprovadamente infectado por *L. infantum*; **C-:** controle negativo de cão saudável não infectado; **Lb:** controle positivo para *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/1975/M2903); **N:** controle negativo sem DNA; **1-40:** amostras de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Os resultados para os cães com sinais clínicos para a LVC estão sumarizados na Tabela 3. A partir da comparação entre amostras clínicas de coletas invasivas e não invasivas, concluiu-se que a positividade calculada para conjuntiva direita foi significativamente maior do que aquelas obtidas para as demais amostras ($p < 0,05$). Quanto à conjuntiva esquerda, não houve diferença estatística entre sua frequência de resultados positivos e aquelas obtidas para pele de orelha e medula óssea ($p > 0,05$). Porém, houve diferença estatística significativa entre as positivities para conjuntiva esquerda e sangue periférico ($p < 0,001$), (Tabela 3).

Tabela 3

Comparação entre amostras clínicas de coleta invasiva e não invasiva segundo as frequências de positividade obtidas por PCR seguida de hibridização em cães com sinais clínicos para LVC naturalmente infectados por *L. infantum* (Grupo 2).

<i>Positividade/amostra</i>	<i>Positividade/amostra</i>	
	Conjuntiva direita 38/40 (95.0%)	Conjuntiva esquerda 35/40 (87.5%)
Pele de orelha 30/40 (75.0%)	$p = 0,012$	$p > 0,05$
Medula óssea 31/40 (77.5%)	$p = 0,023$	$p > 0,05$
Sangue periférico 9/40 (22.5%)	$p < 0,001$	$p < 0,001$

Os valores de p foram calculados utilizando-se o teste de qui-quadrado.

Neste grupo, o índice de positividade para sangue foi significativamente menor do que as positivities para pele de orelha e medula óssea ($p < 0,001$), mas os resultados positivos para estas duas últimas amostras clínicas não foram estatisticamente diferentes entre si ($p > 0,05$) (Figura 21).

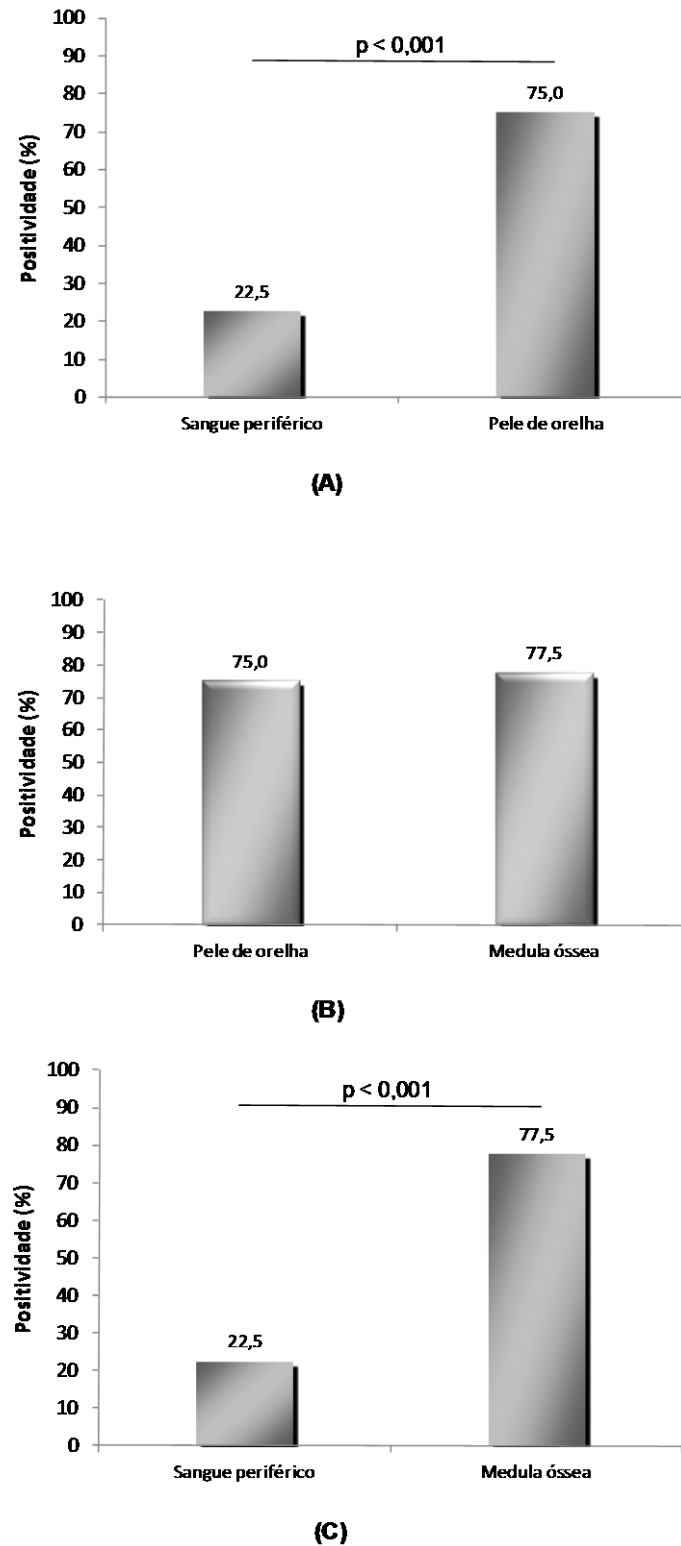


Figura 21: Positividades de PCR-hibridização obtidas de amostras clínicas de coleta invasiva em 40 cães com sinais clínicos para LVC naturalmente infectados por *L. infantum* (Grupo 2). (A): Sangue periférico e Pele de orelha; (B): Pele de orelha e Medula óssea; (C): Sangue periférico e Medula óssea. Os valores de p foram calculados utilizando-se o teste de qui-quadrado.

5.2.5) PCR-hibridização – comparação entre cães com e sem manifestações clínicas para Leishmaniose Visceral

Para as comparações entre os grupos, os dados das conjuntivas direita e esquerda foram combinados e os cães foram considerados positivos para, pelo menos, uma delas. Com isso, as positivities obtidas para esta amostra clínica foram 95% e 87,5% para os cães com e sem sinais clínicos para LVC respectivamente. Estes resultados não foram estatisticamente diferentes entre si ($p > 0,05$) (Figura 22).

Todas as amostras clínicas de coleta invasiva também foram comparadas entre os grupos de cães. Foi verificado que a positividade obtida para pele de orelha nos cães com expressão clínica foi significativamente superior àquela obtida da mesma amostra clínica em cães sem sinais clínicos para LVC ($p = 0,006$). A mesma relação foi detectada quando os resultados positivos de medula óssea foram comparados entre os grupos ($p = 0,011$). Ao contrário, as frequências de positividade calculadas para sangue periférico em ambos os grupos foram estatisticamente equivalentes ($p > 0,05$) (Figura 22).

5.2.6) Identificação das espécies de Leishmania

Os resultados positivos obtidos dos ensaios de hibridização foram todos identificados como *L. infantum*. Os ensaios de hibridização com sondas de *L. braziliensis* foram negativos para todas as amostras caninas utilizadas. Os resultados relativos às amostras de pele de orelha foram apresentados na Figura 23.

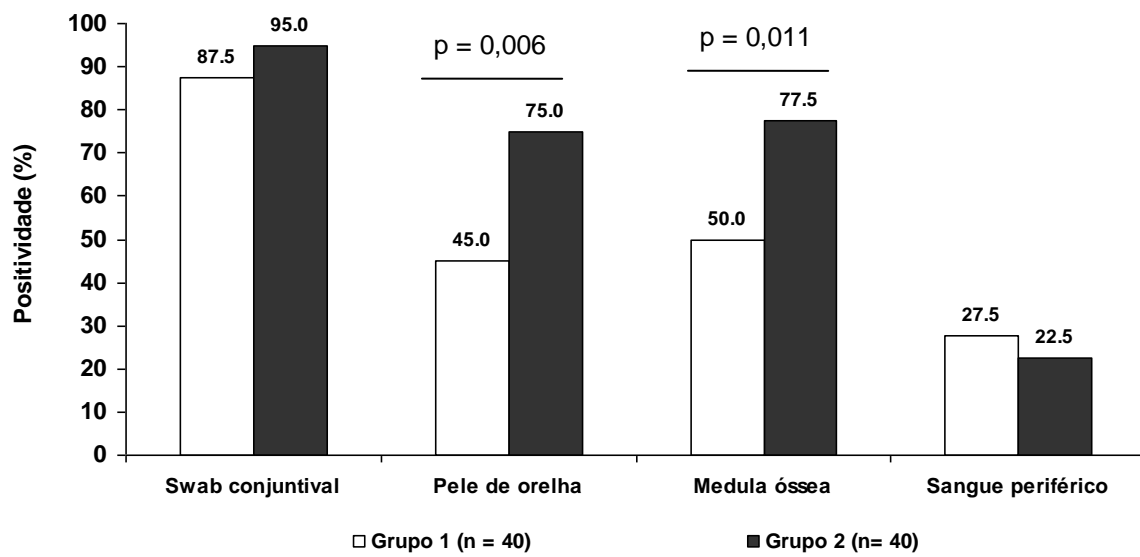
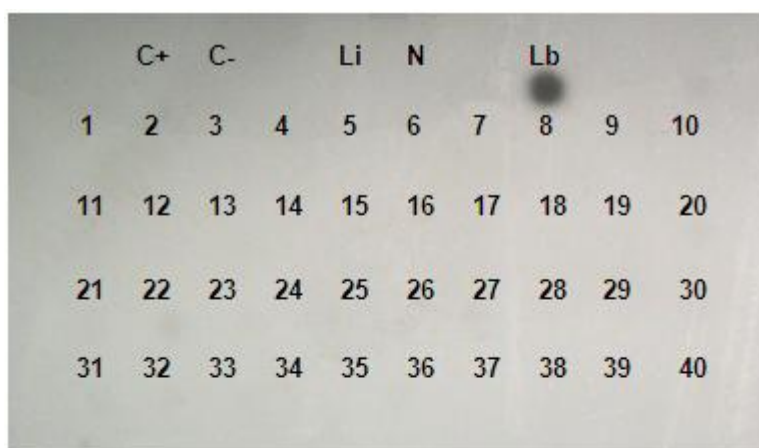
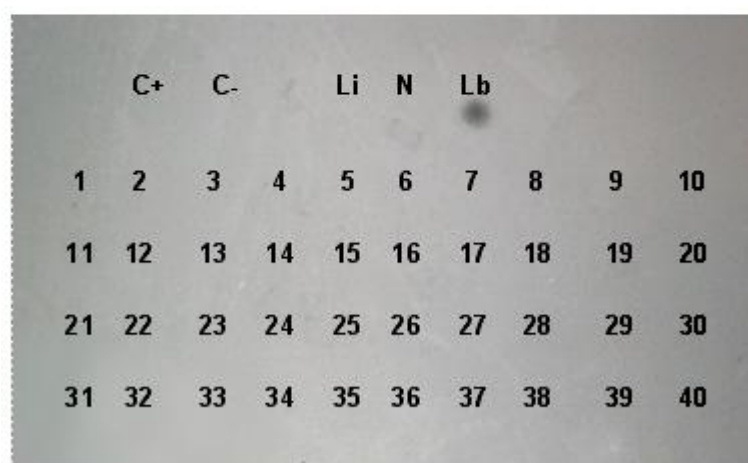


Figura 22: Comparação das positivities obtidas da PCR-hibridização para amostras clínicas do mesmo tipo em cães sem e com sinais clínicos para LVC (Grupos 1 e 2 respectivamente) naturalmente infectados por *L. infantum*.



(A)



(B)

Figura 23: Resultados representativos de hibridização dos produtos de PCR com sonda de *L. braziliensis*. **(A):** hibridização com produtos de PCR obtidos de pele de orelha de cães sem sinais clínicos para LVC naturalmente infectados por *L. infantum* (Grupo 1); **(B):** hibridização com produtos de PCR obtidos de pele de orelha de cães com sinais clínicos para LVC naturalmente infectados por *L. infantum* (Grupo 2); **C+:** controle positivo de cão comprovadamente infectado por *L. infantum*; **C-:** controle negativo de cão saudável não infectado; **Li:** controle positivo para *L. infantum* (cepa MHOM/BR/1973/BH46); **N:** controle negativo sem DNA; **Lb:** controle positivo para *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/1975/M2903); **1-40:** amostras de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

5.2.7) Medidas de sensibilidade e especificidade para PCR-hibridização

Os índices de sensibilidade e especificidade foram calculados para a técnica de PCR-hibridização com a finalidade de averiguar a acurácia deste teste diagnóstico, de forma preliminar, para cada amostra clínica avaliada. O teste parasitológico por mieloculturas foi considerado o padrão ouro de referência para a determinação das medidas de sensibilidade e especificidade. No grupo de cães sem expressão clínica, a maior sensibilidade foi obtida para o *swab* conjuntival (85%), ao passo que a especificidade nesta amostra clínica foi de 88%. As amostras de coleta invasiva apresentaram baixa sensibilidade, não ultrapassando o índice de 54%. No entanto, foram verificadas altas especificidades: 93% para medula óssea e 100% para pele de orelha e sangue periférico (Tabela 4).

Nos cães do grupo 2, a maior sensibilidade e a menor especificidade foram obtidas com o *swab* conjuntival: 97% e 61% respectivamente. Ao contrário, a menor sensibilidade e maior especificidade foram detectadas para o sangue periférico: 25% e 94% respectivamente. Os valores calculados para medula óssea e pele de orelha foram intermediários (Tabela 5).

Tabela 4

Medidas de sensibilidade e especificidade da PCR-hibridização para diferentes amostras clínicas em 40 cães sem sinais clínicos naturalmente infectados por *L. infantum* (Grupo 1*).

<i>Amostras Clínicas</i>	<i>Sensibilidade** (IC 95%)</i>	<i>Especificidade** (IC 95%)</i>
<i>Swab</i> conjuntival ^Δ	85% (69,9 – 93,6)	88% (64 – 96,5)
Medula óssea	54% (38,2 – 69,5)	93% (70,2 – 98,8)
Pele de orelha	51% (35,6 - 67)	100% (79,6 - 100)
Sangue periférico	31% (18,6 - 48)	100% (79,6 - 100)

*10 cães do grupo controle foram utilizados na realização dos cálculos.

**Para a obtenção das medidas, o teste parasitológico por mielocultura foi adotado como padrão ouro.

^Δ Apenas a conjuntiva direita foi considerada para os cálculos.

IC = Intervalo de confiança.

Tabela 5

Medidas de sensibilidade e especificidade da PCR-hibridização para diferentes amostras clínicas em 40 cães com sinais clínicos e naturalmente infectados por *L. infantum* (Grupo 2*).

<i>Amostras Clínicas</i>	<i>Sensibilidade** (IC 95%)</i>	<i>Especificidade** (IC 95%)</i>
Swab conjuntival ^Δ	97% (84,3 – 99,4)	61% (38,6 – 79,7)
Medula óssea	84% (68,2 – 93,1)	78% (54,8 - 91)
Pele de orelha	78% (61,2 - 89)	72% (49,1 – 87,5)
Sangue periférico	25% (13,42)	94% (74,2 - 99)

*10 cães do grupo controle foram utilizados na realização dos cálculos.

**Para a obtenção das medidas, o teste parasitológico por mielocultura foi adotado como padrão ouro.

^Δ Apenas a conjuntiva direita foi considerada para os cálculos.

IC = Intervalo de confiança.

5.2.8) PCR em tempo real – parte 1

A quantificação da carga parasitária foi realizada para todas as amostras clínicas, exceto o sangue periférico, dos cães de ambos os grupos. No grupo de cães sem expressão clínica da LVC, as cargas parasitárias estimadas no *swab* conjuntival e medula óssea foram estatisticamente equivalentes ($p > 0,05$). Por outro lado, a carga parasitária obtida para pele de orelha foi superior àquelas aferidas para as demais amostras ($p < 0,0001$). Estes resultados são sumarizados na Figura 24A.

Quanto ao grupo de cães com sinais clínicos, as mesmas relações estatísticas foram obtidas entre as amostras clínicas. Não houve diferença significativa entre as cargas parasitárias estimadas para o *swab* conjuntival e medula óssea ($p > 0,05$), ao passo que a carga aferida para pele de orelha foi maior em relação às demais ($p < 0,0001$), (Figura 24B).

Posteriormente, as cargas parasitárias estimadas foram comparadas aos pares entre os grupos de cães naturalmente infectados. Neste caso, a mesma amostra clínica

foi confrontada entre os grupos. A carga parasitária obtida para o *swab* conjuntival em cães com expressão clínica da LVC foi superior em relação àquela dos cães sem sinais clínicos ($p = 0,028$). Esta mesma relação entre os grupos foi detectada para medula óssea ($p = 0,002$). Entretanto, as cargas parasitárias estimadas para pele de orelha foram estatisticamente equivalentes entre os grupos de cães naturalmente infectados ($p > 0,05$), (Figura 25)

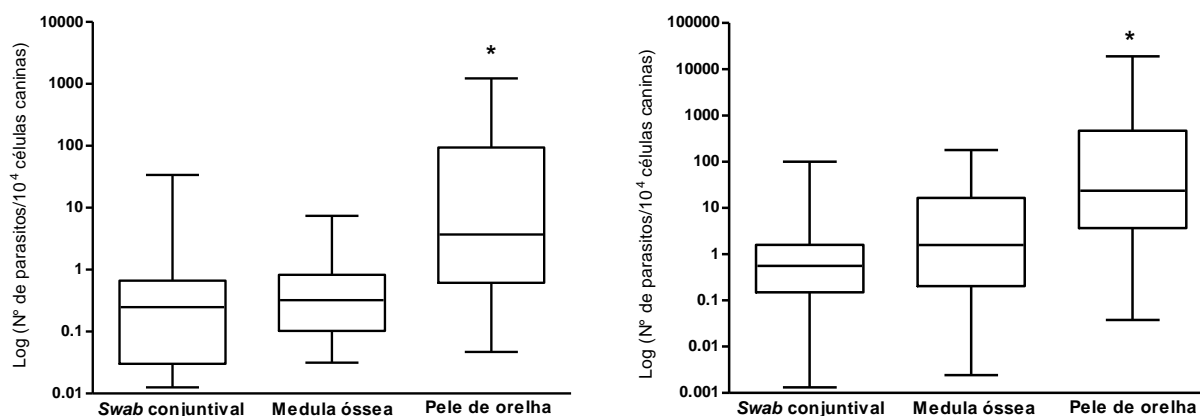


Figura 24: Cargas parasitárias estimadas em diferentes amostras clínicas de cães sem sinais clínicos

(A) e com sinais clínicos da LVC (B) naturalmente infectados por *L. infantum*. *O grupo difere dos demais segundo o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn ($p < 0,0001$).

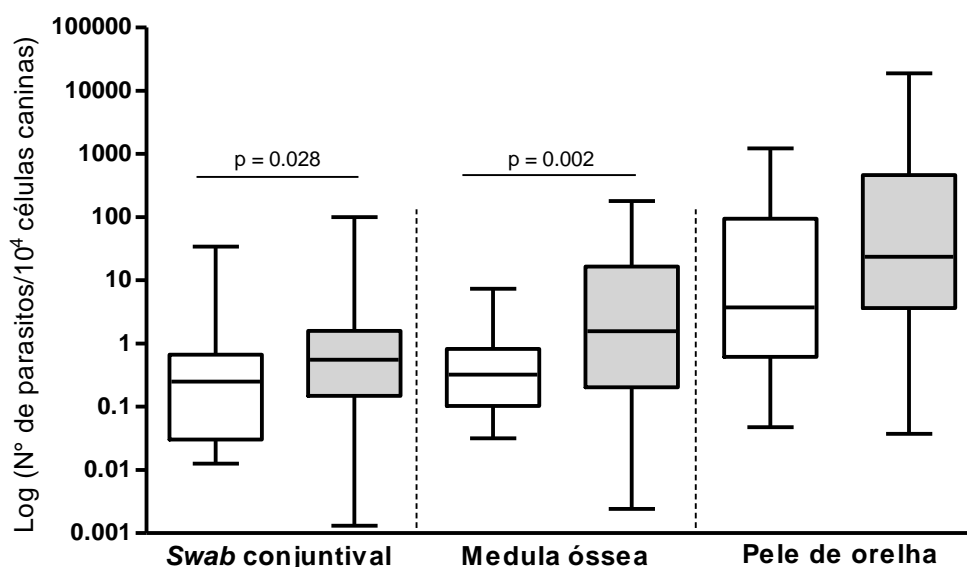


Figura 25: Cargas parasitárias obtidas de *swab* conjuntival, medula óssea e pele de orelha de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Representação em branco: grupo de cães sem sinais clínicos; Representação em cinza: grupo de cães com sinais clínicos. Os valores de p foram calculados utilizando-se o teste de Mann-Whitney.

5.2.9) *Correlação: Títulos de IgG total x carga parasitária*

A correlação entre os títulos de anticorpos IgG total e a carga parasitária foi investigada para verificar a possível existência de associação entre estas variáveis. Para isso, o *swab* conjuntival, medula óssea e pele de orelha dos cães com e sem expressão clínica foram utilizados. Foram detectadas correlações positivas e significativas apenas para as amostras de medula óssea e pele de orelha de cães sem sinais clínicos ($p = 0,019$ e $p < 0,0001$ respectivamente). O conjunto destes resultados está representado na Figura 26.

5.3) Resultados da parte 2: avaliação do *swab* nasal para o diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral Canina

Esta parte envolveu um total de 62 cães naturalmente infectados em que apenas 4 animais foram considerados sem sinais clínicos. Portanto, por razões estatísticas, todos os cães infectados foram analisados em um único grupo. Nesta etapa, o *swab* nasal foi analisado juntamente com as amostras clínicas avaliadas na parte 1 deste estudo, exceto o sangue periférico.

5.3.1) *Bioquímica sérica – parte 2*

Os níveis séricos de creatinina e uréia obtidos dos cães naturalmente infectados foram considerados estatisticamente equivalentes aos do grupo controle ($p > 0,05$). Por outro lado, os níveis de albumina foram inferiores ($p = 0,0005$) e os valores obtidos para globulina sérica foram superiores ($p = 0,0002$) às respectivas medidas referentes aos cães saudáveis. Devido a isso, a razão albumina/globulina dos cães infectados foi estatisticamente menor em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$), (Figura 27).

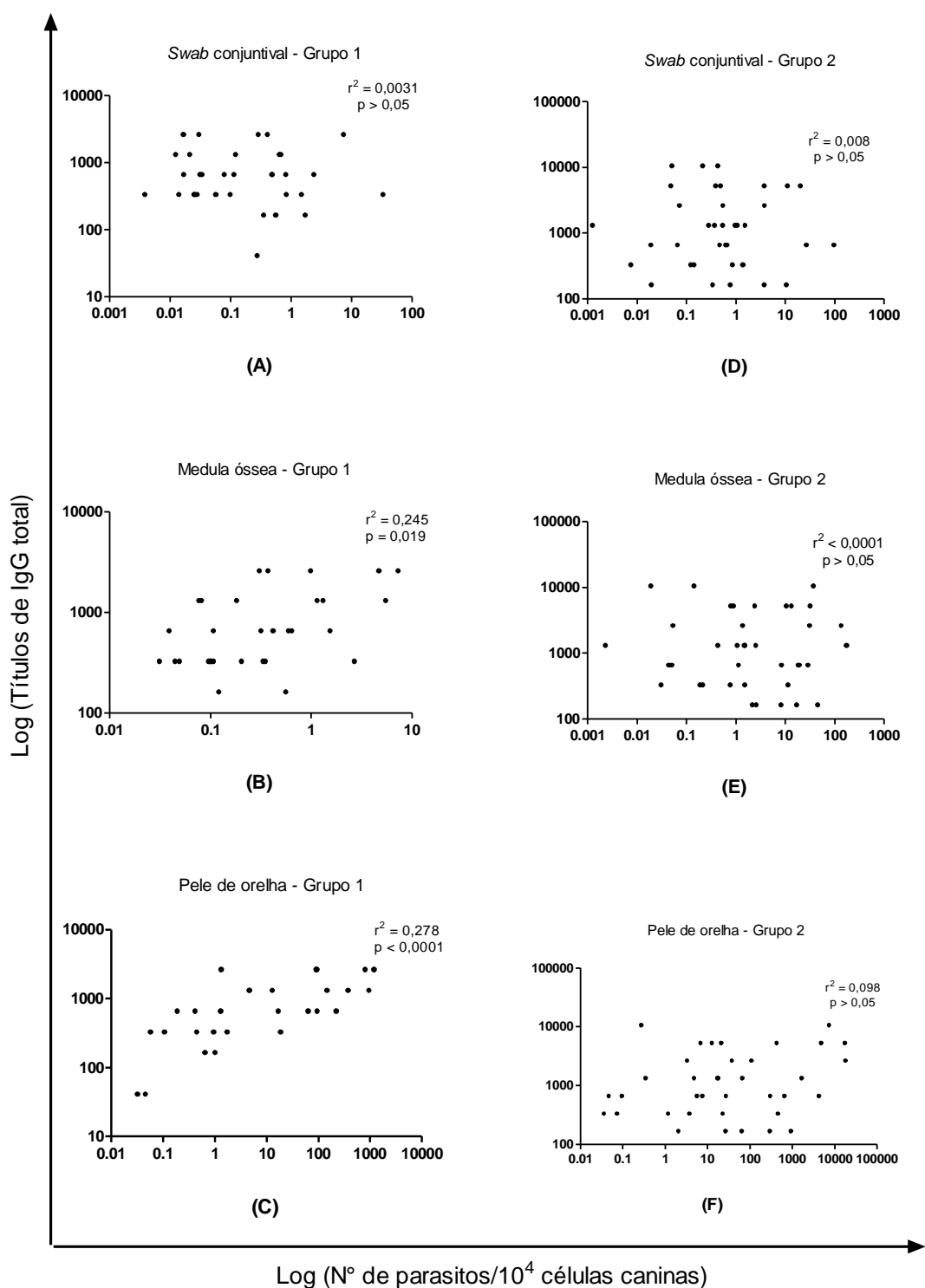


Figura 26: Correlação entre títulos de IgG total e carga parasitária presente em diferentes amostras clínicas de cães com e sem sinais clínicos para LVC e naturalmente infectados por *L. infantum*. Os gráficos (A), (B) e (C) correspondem, respectivamente, às amostras de swab conjuntival, medula óssea e pele de orelha referentes aos cães sem expressão clínica (Grupo 1). As letras (D), (E) e (F) correspondem, respectivamente, às amostras de swab conjuntival, medula óssea e pele de orelha referentes aos cães com expressão clínica (Grupo 2).

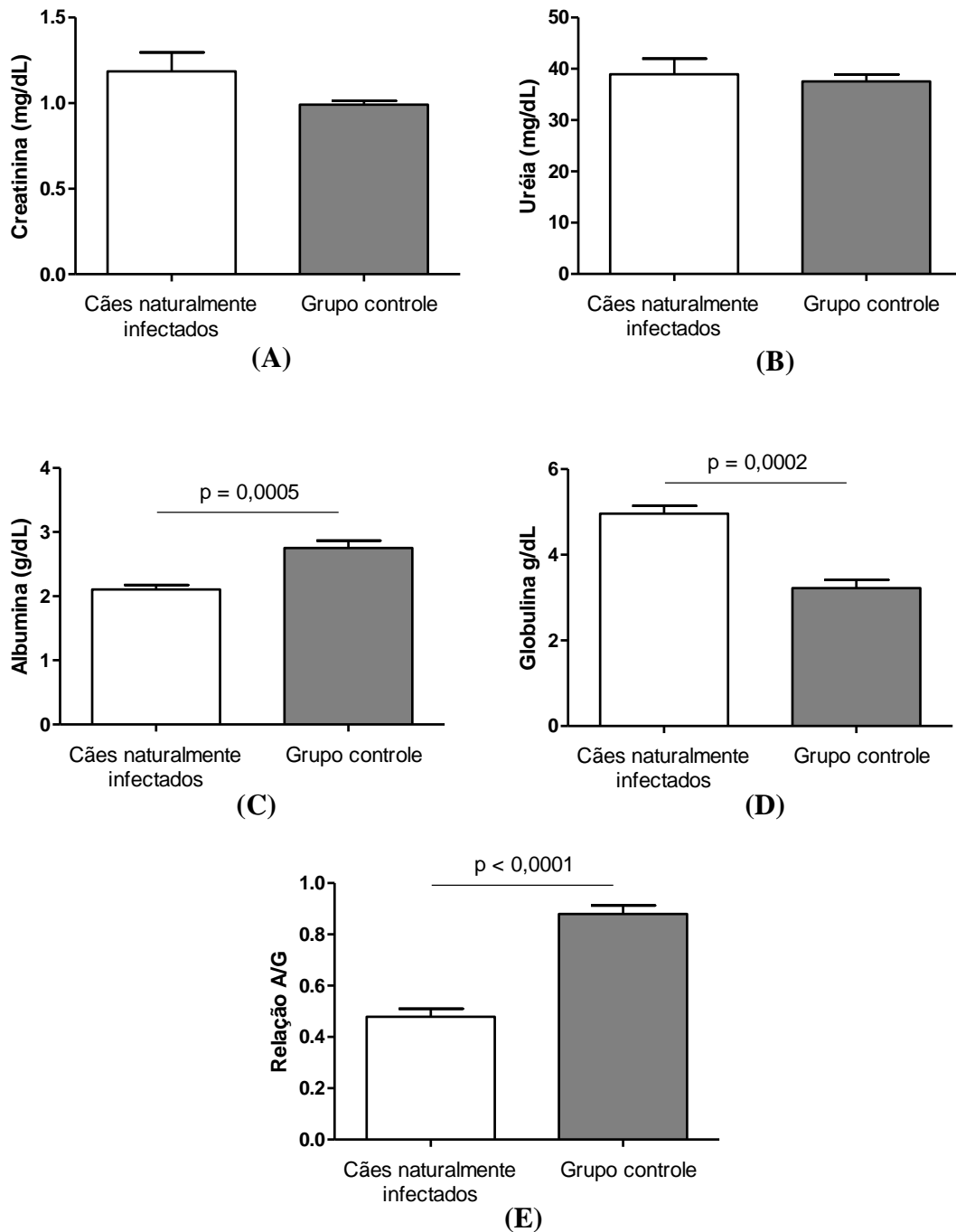


Figura 27: Parâmetros bioquímicos obtidos de 62 cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Parte 2). (A): creatinina, (B): uréia, (C): albumina, (D): globulina, (E): relação albumina/globulina (A/G). Grupo controle: cães saudáveis não infectados. Os valores de *p* foram calculados utilizando-se o teste *t* não pareado.

5.3.2) Sorologia – Parte 2

Com base nos testes sorológicos realizados no laboratório de Sorologia e Biologia de *Leishmania* do ICB/UFMG, 2 animais desta etapa do trabalho apresentaram resultado negativo apenas para ELISA e 1 cão foi negativo apenas para RIFI. Apenas 1 animal teve resultado negativo simultaneamente para estes dois testes sorológicos. Todos esses cães, com algum resultado negativo na sorologia, apresentaram positividade na mielocultura e foram, portanto, incluídos no estudo. As medidas de absorvância obtidas no teste ELISA são mostradas na Figura 28. Os títulos obtidos na RIFI variaram de 1:160 até 1:20.480.

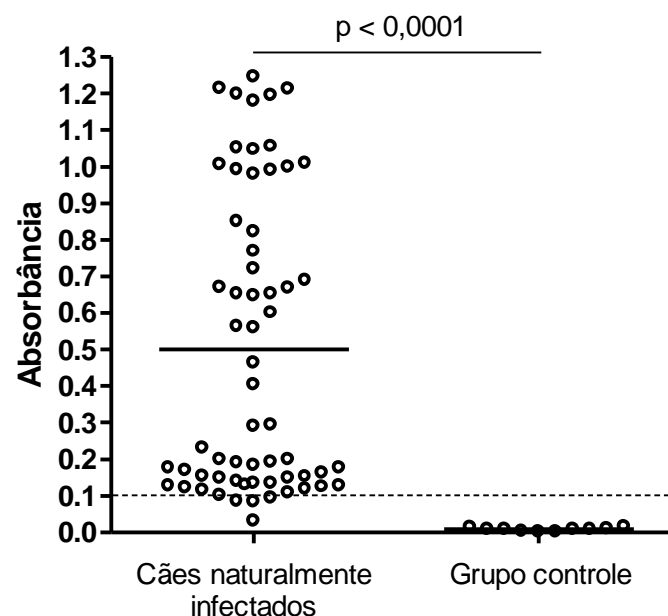


Figura 28: Medidas de absorvância obtidas do imunoenensaio de ELISA para cães naturalmente infectados por *L. infantum* (parte 2). O ponto de corte (= 0,100) está representado pela linha pontilhada. Os grupos diferem entre si segundo o teste de Mann – Whitney.

5.3.3) PCR complexo *Leishmania donovani* específica – parte 2

Nesta etapa do trabalho, para o diagnóstico molecular qualitativo da LVC, foi realizada uma técnica de PCR complexo *L. donovani* específica (cPCR) utilizando-se os iniciadores LVI-LV2 que geram um produto amplificado de 100 pb (Piarroux et al, 1993). As positivities obtidas neste teste e as respectivas amostras clínicas analisadas foram: 76% (47/62) para *swab* conjuntival; 87% (54/62) para *swab* nasal; 81% (50/62)

para pele de orelha; 90% (56/62) para medula óssea (Tabela 6). As Figuras 29, 30, 31 e 32 ilustram géis de eletroforese representativos com os produtos de PCR obtidos de cada amostra clínica utilizada nesta etapa.

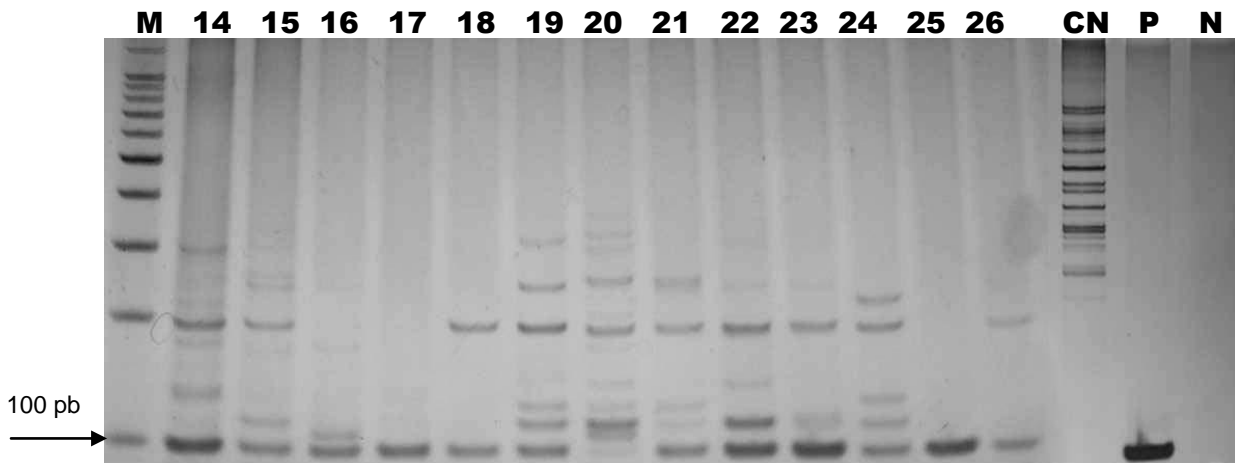


Figura 29: Gel de poliacrilamida representativo com produtos de PCR referentes ao *swab* conjuntival de cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Parte 2). **M:** marcador de peso molecular – 100 pb; **CN:** cão saudável negativo; **P:** controle positivo para *L. infantum* (cepa MHOM/BR/1973/BH46); **N:** controle negativo sem DNA; **14 - 26:** amostras de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

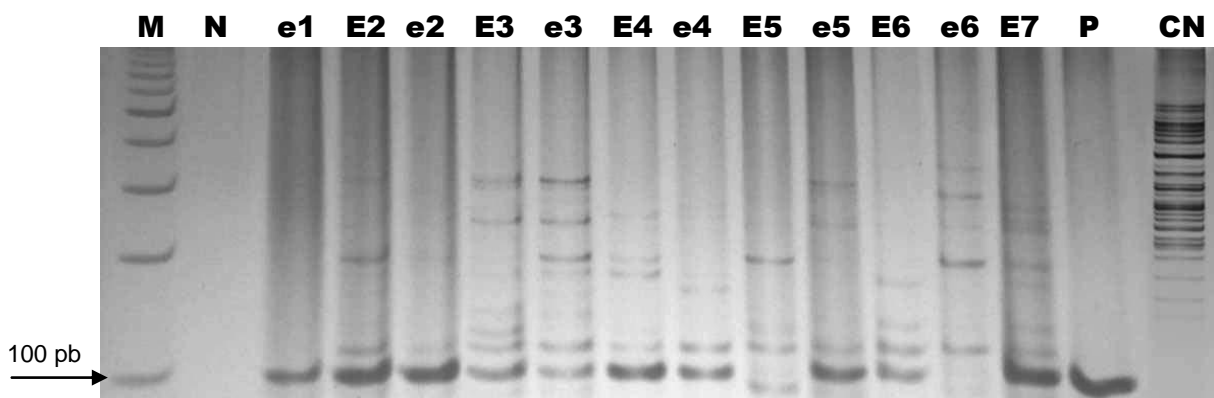


Figura 30: Gel de poliacrilamida representativo com produtos de PCR referentes ao *swab* nasal de cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Parte 2). **M:** marcador de peso molecular – 100 pb; **N:** controle negativo sem DNA; **P:** controle positivo para *L. infantum* (cepa MHOM/BR/1973/BH46); **CN:** cão saudável negativo; **e1 - E7:** amostras de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

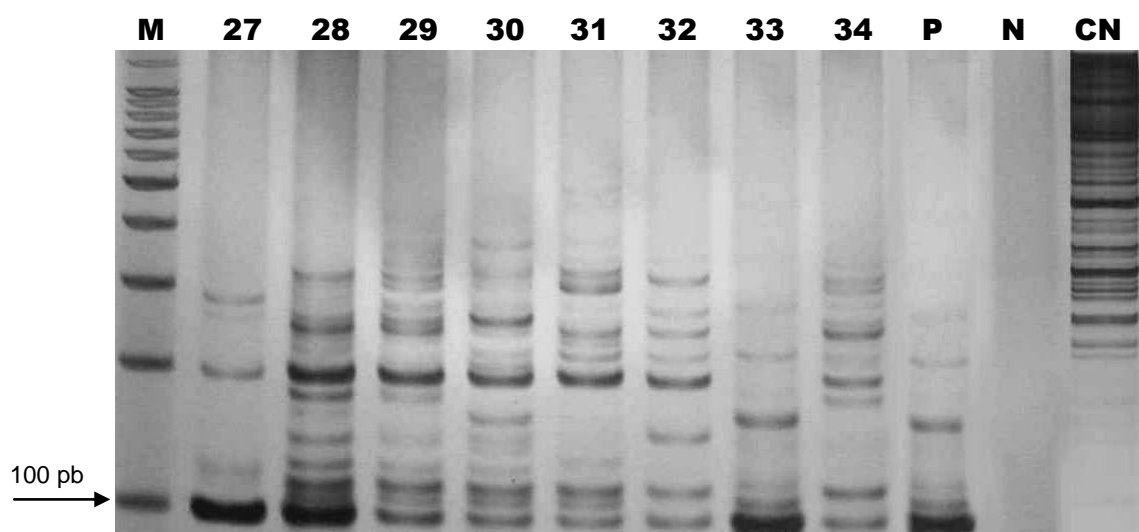


Figura 31: Gel de poliacrilamida representativo com produtos de PCR referentes a medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Parte 2). **M:** marcador de peso molecular – 100 pb; **P:** controle positivo para *L. infantum* (cepa MHOM/BR/1973/BH46); **N:** controle negativo sem DNA; **CN:** cão saudável negativo; **27 – 34:** amostras de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

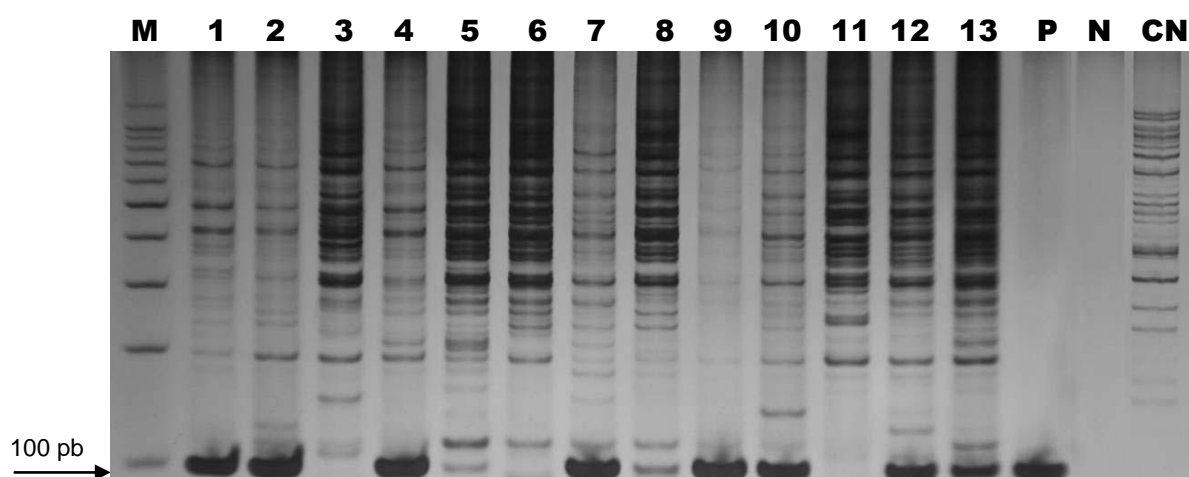


Figura 32: Gel de poliacrilamida representativo com produtos de PCR referentes a pele de orelha de cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Parte 2). **M:** marcador de peso molecular – 100 pb; **P:** controle positivo para *L. infantum* (cepa MHOM/BR/1973/BH46); **N:** controle negativo sem DNA; **CN:** cão saudável negativo; **1 – 13:** amostras de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Os resultados referentes às amostras clínicas de coleta não invasiva foram comparados, dois a dois, com aqueles correspondentes aos de pele de orelha e medula óssea. Houve diferença estatística significativa apenas entre as positivities do *swab* conjuntival e de medula óssea ($p = 0,031$). Nas demais comparações, houve equivalência estatística entre os resultados ($p > 0,05$) (Tabela 6).

Não foi detectada diferença estatística entre as frequências de positividade entre os *swabs* conjuntival e nasal ($p > 0,05$). A mesma inferência foi obtida na comparação entre os dados de medula óssea e pele de orelha ($p > 0,05$), (Figura 33).

Tabela 6

Comparação entre amostras clínicas de coleta invasiva e não invasiva segundo as frequências de positividade obtidas por PCR convencional complexo *L. donovani* específica em cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Parte 2).

<i>Positividade/amostra</i>	<i>Positividade/amostra</i>	
	<i>Swab conjuntival*</i> 47/62 (76%)	<i>Swab nasal**</i> 54/62 (87%)
Pele de orelha 50/62 (81%)	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Medula óssea 56/62 (90%)	$p = 0,031$	$p > 0,05$

*Apenas a conjuntiva esquerda foi considerada;

**Apenas a narina esquerda foi considerada.

Os valores de *p* foram calculados utilizando-se o teste qui-quadrado.

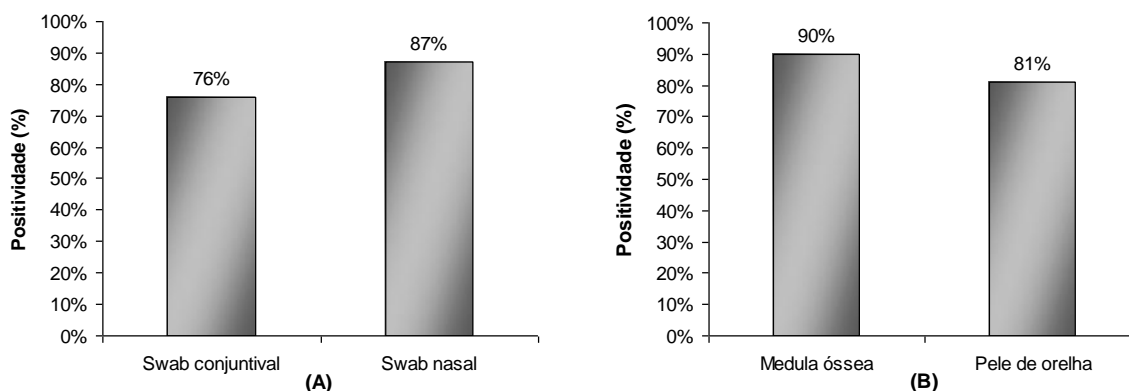


Figura 33: Positividades para PCR convencional complexo *L. donovani* específica obtidas de amostras clínicas de coleta invasiva e não invasiva em 62 cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Parte 2). (A): *Swab* conjuntival e *Swab* nasal; (B): Medula óssea e Pele de orelha.

5.3.4) Medidas de sensibilidade e especificidade para PCR complexo *Leishmania donovani* específica – parte 2

Os valores de sensibilidade e especificidade foram calculados para a cPCR levando-se em conta cada amostra clínica estudada. O teste parasitológico por mielocultura foi considerado o padrão ouro de referência para a determinação destas medidas. Os resultados de sensibilidade e especificidade, respectivamente, foram: 75% e 54,2% para *swab* conjuntival, 87,5% e 50% para *swab* nasal, 93,8% e 54,2% para medula óssea, 79,2% e 50% para pele de orelha (Tabela 7).

Tabela 7:

Medidas de sensibilidade e especificidade da PCR complexo *L. donovani* específica para diferentes amostras clínicas em 62 cães naturalmente infectados por *L. infantum**.

<i>Amostras clínicas</i>	<i>Sensibilidade** (IC 95%)</i>	<i>Especificidade** (IC 95%)</i>
<i>Swab conjuntival</i> ^Δ	75% (61,2 - 85,1)	54,2% (35,1 - 72,1)
<i>Swab nasal</i> ^{ΔΔ}	87,5% (75,3 - 94,1)	50% (31,4 - 68,6)
Medula óssea	93,8% (83,2 - 97,8)	54,2% (35,1 - 72,1)
Pele de orelha	79,2% (65,7 - 88,3)	50% (31,4 - 68,6)

*10 cães do grupo controle foram utilizados na realização dos cálculos.

**Para a obtenção das medidas, o teste parasitológico por mielocultura foi adotado como padrão ouro.

^Δ Apenas a conjuntiva esquerda foi considerada para os cálculos.

^{ΔΔ} Apenas a narina esquerda foi considerada para os cálculos.

IC = Intervalo de confiança.

5.3.5) PCR em tempo real – parte 2

As cargas parasitárias foram estimadas para cada amostra clínica e comparadas dentro do contexto experimental desta etapa do trabalho. Neste caso, a carga parasitária presente no *swab* nasal foi estatisticamente equivalente àquela estimada no *swab* conjuntival ($p > 0,05$). As cargas obtidas de medula óssea e pele de orelha foram equivalentes entre si ($p > 0,05$) e mais altas em relação às outras amostras clínicas ($p < 0,05$), (Figura 34).

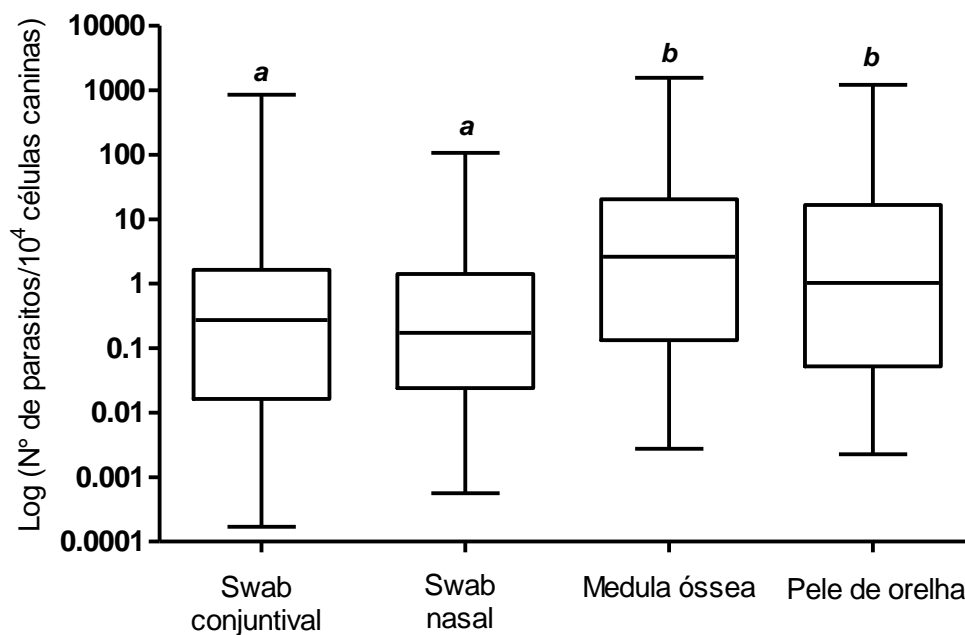


Figura 34: Cargas parasitárias obtidas de *swab* conjuntival, *swab* nasal, medula óssea e pele de orelha de cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Parte 2). Grupos marcados com letras minúsculas distintas diferem entre si segundo o teste de Mann-Whitney.

5.4) Resultados da parte 3: avaliação dos *swabs* oral e da pele de orelha para o diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral Canina

Dos 62 cães naturalmente infectados descritos anteriormente, apenas 28 tiveram o *swab* oral e o *swab* de pele de orelha coletados, além das outras amostras clínicas analisadas na parte 2 deste estudo. Portanto, os dados de biologia molecular referentes a estes 28 animais foram analisados à parte tendo os *swabs* oral e da pele de orelha como referências de comparação. Os dados de bioquímica sérica e sorologia destes cães já foram contemplados nos itens 6.3.1 e 6.3.2.

5.4.1) PCR complexo *Leishmania donovani* específica – parte 3

Neste contexto experimental, as positivities da cPCR para os *swabs* oral e de pele de orelha foram 79% (22/28) e 43% (12/28) respectivamente. As positivities para as demais amostras clínicas foram recalculadas com base no tamanho amostral de 28 animais para permitir a comparação com os resultados obtidos dos *swabs* oral e da pele de orelha. Dessa forma, as frequências de resultados positivos foram: 54% (15/28) para *swab* conjuntival, 75% (21/28) para *swab* nasal, 79% (22/28) para medula óssea e 68% (19/28) para pele de orelha (Figura 35, Tabela 8). Géis de eletroforese representativos com os produtos de PCR obtidos dos *swabs* oral e de orelha são mostrados nas Figuras 36 e 37 respectivamente.

As positivities destas amostras de coleta não invasiva foram comparadas, duas a duas, com aquelas referentes à medula óssea e pele de orelha. Em todas as comparações, houve equivalência estatística ($p > 0,05$), exceto na comparação entre *swab* da pele de orelha e medula óssea em que foi observada uma diferença significativa entre os resultados ($p = 0,013$), (Tabela 8).

Os resultados referentes às amostras coletadas com *swab* também foram comparadas dois a dois. As positivities para os *swabs* oral e nasal foram significativamente maiores do que aquela obtida para *swab* de pele de orelha ($p = 0,013$ e $p = 0,029$ respectivamente). Para as demais comparações, não foi observada significância estatística ($p > 0,05$), (Figura 35).

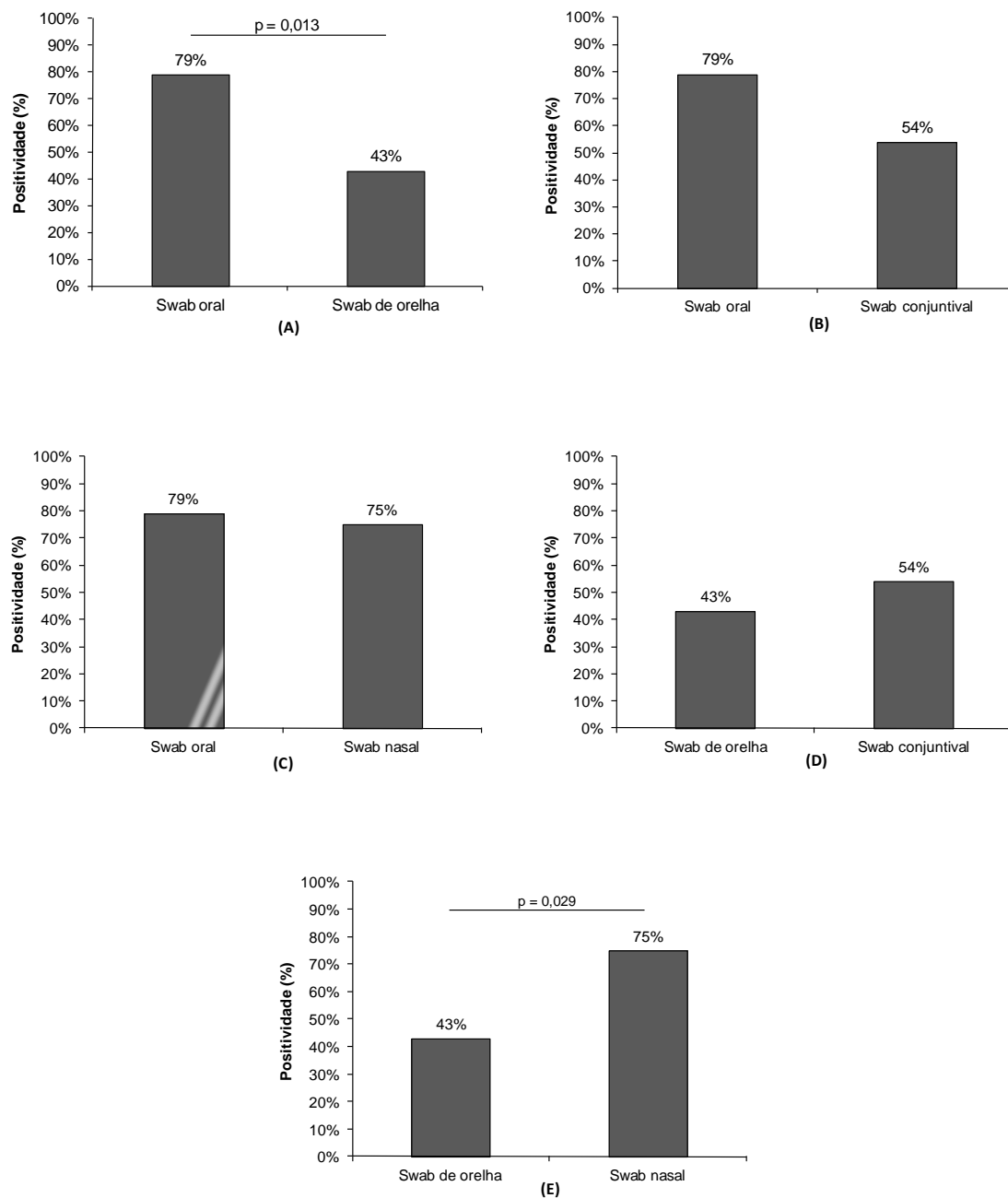


Figura 35: Positividades da PCR complexo *L. donovani* específica obtidas de amostras clínicas coletadas com *swab* em 28 cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Parte 3). (A): *Swab* oral e *Swab* da pele de orelha; (B): *Swab* oral e *Swab* conjuntival; (C): *Swab* oral e *Swab* nasal; (D): *Swab* da pele de orelha e *Swab* conjuntival; (E): *Swab* da pele de orelha e *Swab* nasal. Os valores de *p* foram calculados utilizando-se o teste exato de Fisher.

Tabela 8

Comparação entre amostras clínicas de coleta invasiva e não invasiva segundo as frequências de positividade obtidas por PCR convencional complexo *L. donovani* específica em cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Parte 3).

<i>Positividade/amostra</i>	<i>Positividade/amostra</i>	
	<i>Swab oral</i> (22/28) 79%	<i>Swab de orelha</i> (12/28) 43%
Pele de orelha (19/28) 68%	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Medula óssea (22/28) 79%	$p > 0,05$	$p = 0,013$

Os valores de p foram calculados utilizando-se o teste exato de Fisher.

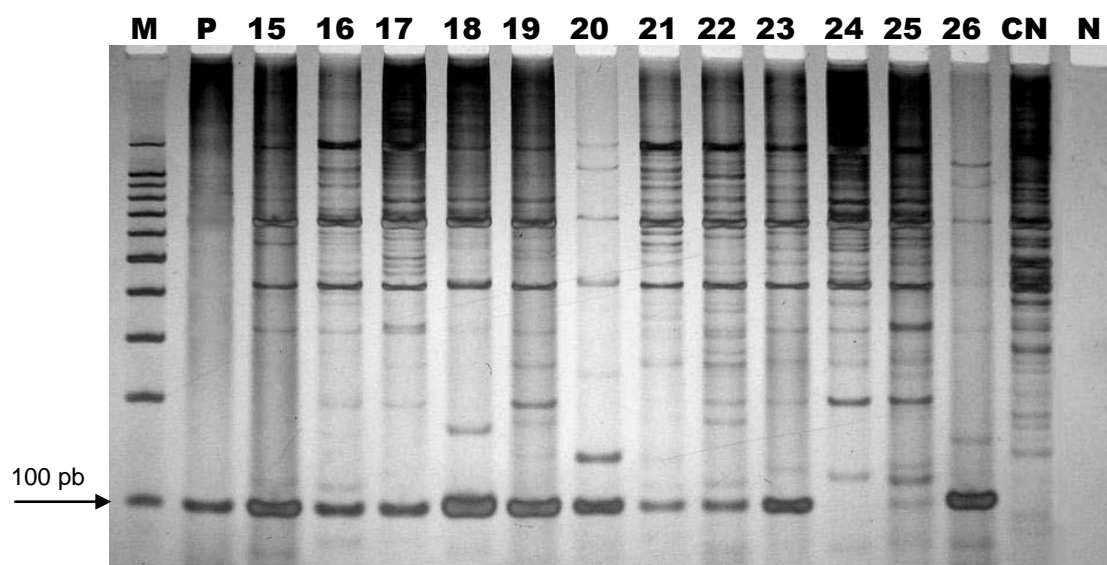


Figura 36: Gel de poliacrilamida representativo com produtos de PCR referentes ao *swab* oral de cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Parte 3). **M:** marcador de peso molecular – 100 pb; **P:** controle positivo para *L. infantum* (cepa MHOM/BR/1973/BH46); **CN:** cão saudável negativo; **N:** controle negativo sem DNA; **15 – 26:** amostras de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

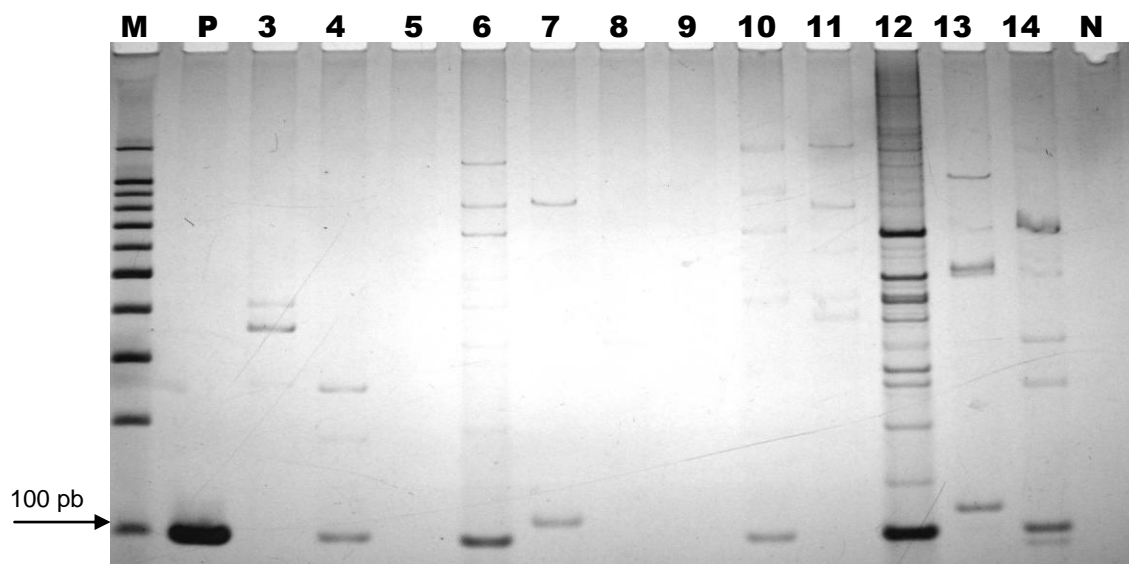


Figura 37: Gel de poliacrilamida representativo com produtos de PCR referentes ao *swab* da pele de orelha de cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Parte 3). **M:** marcador de peso molecular – 100 pb; **P:** controle positivo para *L. infantum* (cepa MHOM/BR/1973/BH46); **N:** controle negativo sem DNA; **3 – 14:** amostras de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

5.4.2) Medidas de sensibilidade e especificidade para PCR complexo *Leishmania donovani* específica – parte 3

Os índices de sensibilidade e especificidade da PCR convencional para os *swabs* oral e de pele de orelha foram obtidos. Os dados estão representados na Tabela 9.

Tabela 9

Medidas de sensibilidade e especificidade da PCR complexo *L. donovani* específica para diferentes amostras clínicas em 28 cães naturalmente infectados por *L. infantum**.

<i>Amostras Clínicas</i>	<i>Sensibilidade** (IC 95%)</i>	<i>Especificidade** (IC 95%)</i>
<i>Swab oral</i>	80% (60,9 - 91,1)	84,6% (57,8 - 95,7)
<i>Swab da pele de orelha</i>	48% (30 - 66,5)	100% (77,2 - 100)

*10 cães do grupo controle foram utilizados na realização dos cálculos.

**Para a obtenção das medidas, o teste parasitológico por mielocultura foi adotado como padrão ouro.

IC = Intervalo de confiança.

5.4.3) PCR em tempo real – parte 3

No contexto experimental da parte 3 deste trabalho, as cargas parasitárias em cada amostra clínica foram estimadas e os resultados referentes aos *swabs* oral e da pele de orelha foram considerados os parâmetros de comparação. Neste caso, a carga parasitária no *swab* oral foi equivalente àquela estimada nos *swabs* conjuntival e nasal ($p > 0,05$) e significativamente inferior às cargas referentes à medula óssea e pele de orelha ($p < 0,05$). Não foi possível aferir carga parasitária para o *swab* da pele de orelha, pois as amplificações obtidas com a qPCR foram negativas ou inespecíficas. Os resultados das cargas parasitárias estão representados na Figura 38.

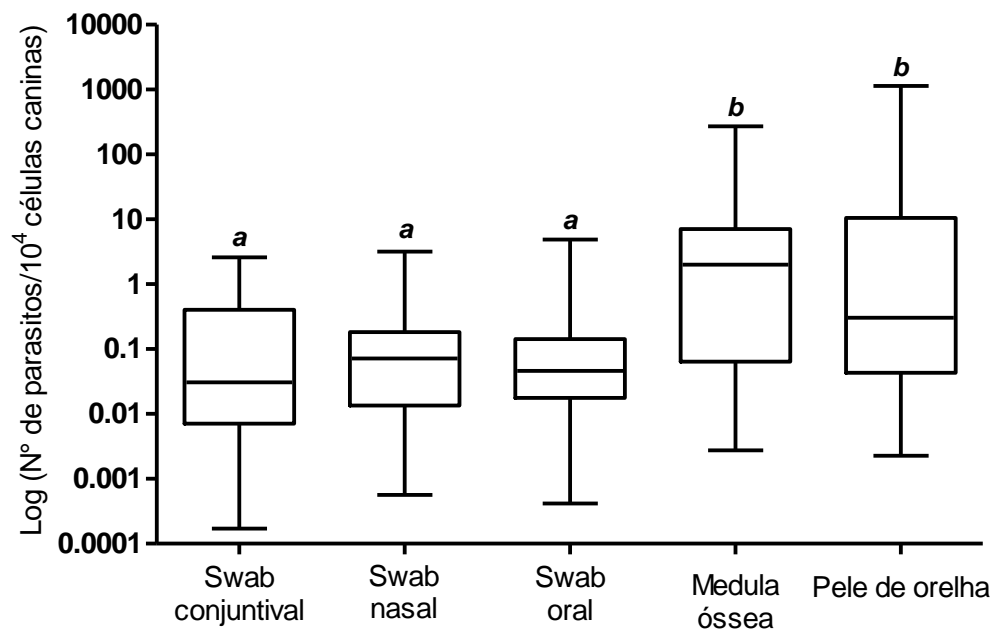


Figura 38: Cargas parasitárias obtidas de *swab* conjuntival, *swab* nasal, *swab* oral, medula óssea e pele de orelha de cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Parte 3). Grupos marcados com letras minúsculas distintas diferem entre si segundo o teste de Mann-Whitney.

DISCUSSÃO

6) DISCUSSÃO

O diagnóstico da LVC apresenta dois propósitos principais. O primeiro é confirmar a doença em cães que apresentam sinais clínicos e/ou anormalidades clínico-patológicas compatíveis à LVC. O segundo é investigar a presença de infecção para estudos epidemiológicos e inquéritos caninos, triagem de animais saudáveis em regiões endêmicas, geralmente a pedido de seus donos, e prevenção da transmissão por transfusão sanguínea em clínicas que realizam este procedimento. Além disso, este segundo propósito do diagnóstico se presta a evitar a importação de cães infectados para regiões não endêmicas e a monitorar a resposta ao tratamento da LVC nos países onde a terapia canina é legalizada (Miró et al. 2008).

Com base nisso, a distinção entre infecção e doença clínica é crucial para a adoção de medidas mais adequadas e melhor direcionadas para o controle da LVC. Para isso, o diagnóstico deve ser eficaz. Porém, existem características epidemiológicas da LVC que impõem grandes desafios para o diagnóstico correto. Cães recentemente infectados podem apresentar resultados diagnósticos falsos negativos pelas técnicas disponíveis, simplesmente em razão de o parasitismo ou das consequências da infecção se encontrarem em níveis ainda não detectáveis (Oliva et al. 2006).

Outro fato importante é a existência de um grande contingente de cães infectados sem sinais clínicos da LVC em regiões endêmicas para os quais os testes diagnósticos utilizados rotineiramente exibem reduzida sensibilidade. As estimativas do número de animais infectados sem expressão clínica são muito variáveis, indo de 25% e chegando até 80% de acordo com a região geográfica, com o método de diagnóstico adotado e amostras clínicas utilizadas (Berrahal et al. 1996, Papadopoulou et al. 2005, Queiroz et al. 2009).

Em diferentes locais do mundo como no Brasil, Palestina, regiões da Europa e norte da África, a prevalência registrada da doença tem sido inferior a 10%, enquanto a prevalência real da infecção é certamente mais elevada (Nejjar et al. 1988, Papadopoulou et al. 2005, Nasereddin et al. 2006, Rondon et al. 2008). Ainda não está claro se estes cães sem expressão clínica da LVC se tornam livres da infecção, ou se irão, e quando irão expressar os sinais clínicos compatíveis à LVC (Oliva et al. 2006).

Os testes sorológicos realizados em larga escala para triagem de cães apresentam limitações uma vez que podem gerar resultados falsos positivos devido à reatividade cruzada com outras espécies de *Leishmania* e com *Trypanosoma cruzi* nas regiões onde

há sobreposição destas espécies com *L. infantum* (Andrade et al. 2006, Troncarelli et al. 2009). Por outro lado, podem ocorrer resultados falsos negativos em cães imunossuprimidos presentes em regiões endêmicas (Fisa et al. 2001).

Embora os testes parasitológicos não moleculares apresentem alta especificidade, a sensibilidade é reduzida especialmente nos cães sem expressão clínica da LVC (Piarroux et al. 1994, Saridomichelakis et al. 2005). Estes testes também envolvem coletas invasivas de amostras clínicas e requerem a participação de profissionais especializados e experientes para as análises. Além disso, os meios de cultura são passíveis de contaminação e as análises, tanto em lâminas coradas como em culturas, podem resultar em falsos positivos devido a artefatos. Como estas avaliações são dependentes da carga parasitária, falsos negativos também podem ocorrer se a quantidade de parasitos for muito baixa ou se os aspirados de fluidos biológicos estiverem muito diluídos (Piarroux et al. 1994).

O método de imunohistoquímica é uma alternativa que incrementa a sensibilidade do diagnóstico (Tafari et al. 2004). No entanto, estas técnicas não são apropriadas para estudos epidemiológicos ou de larga escala, pois são mais laboriosas, demoradas e envolvem amostragens invasivas, além de alta especialização técnica (Gomes et al. 2008).

Os métodos moleculares baseados em PCR têm sido considerados um importante recurso auxiliar para o diagnóstico da LVC devido às altas sensibilidade e especificidade apresentadas por tais técnicas (Gomes et al. 2007, Moreira et al. 2007). Embora a PCR exija infraestrutura mais elaborada e alto treinamento técnico, ela se tornou uma ferramenta de grande valia para o diagnóstico e estudos epidemiológicos da LVC.

Torna-se claro que o diagnóstico preciso da LVC é complexo e requer, frequentemente, a utilização de diferentes técnicas para a obtenção de um resultado conclusivo. O fato de os cães infectados apresentarem amplo espectro clínico e anormalidades clínico-patológicas diversas e não específicas reforça a necessidade do uso combinado de métodos laboratoriais para o diagnóstico diferencial da LVC (Paltrinieri et al. 2010).

No presente trabalho, utilizamos uma associação de testes sorológicos e parasitológicos para a inclusão dos cães, pois estas técnicas isoladas são mais limitadas. Neste sentido, procuramos adotar um critério mais rigoroso o qual envolveu a exigência prévia de dupla positividade dos testes de ELISA e RIFI adotados no CCZ-BH em

conformidade com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil. Além disso, a inclusão dos cães se deu pela combinação de testes parasitológicos, baseados em microscopia óptica, mielocultura, e positividade simultânea dos testes sorológicos de ELISA e RIFI padronizados com o uso de antígenos de *L. infantum* nos laboratórios de Sorologia e Biologia de *Leishmania* (ICB/UFMG).

A avaliação de manifestações clínicas físicas e os parâmetros de bioquímica sérica, embora tenham valor limitado para o diagnóstico da LVC, são úteis para auxiliar o entendimento do estado clínico, prognóstico e evolução do tratamento de cães infectados, nas circunstâncias em que este último procedimento é legalizado (Costa-Val et al. 2007). No presente estudo, os níveis séricos de creatinina, uréia, albumina e globulina foram utilizados como complemento à avaliação clínica para descrição dos cães incluídos.

Na primeira parte desta pesquisa, os cães foram separados segundo formas clínicas polares da LVC. Tornou-se claro que os cães com sinais clínicos apresentavam disfunção renal uma vez que seus níveis de creatinina foram superiores aos demais grupos, apesar de os níveis de uréia terem sido normais e compatíveis às medidas referentes aos outros grupos. Esta inferência é reforçada pelo fato dos cães com expressão clínica terem apresentado marcada redução de albumina. Esta diminuição é geralmente causada por lesões hepáticas, subnutrição e/ou nefropatias que podem estar associadas à LVC (Slappendel 1988, Noli 1999, Amusatogui et al. 2003). Os níveis detectados de globulina sérica nos grupos 1 e 2 superaram aqueles do grupo controle, o que levou a uma redução da razão albumina/globulina nos cães infectados abaixo do nível considerado normal. Esta razão foi acentuadamente menor nos cães com expressão clínica em relação aos demais, o que enfatiza o estado doentio daquele grupo. A razão albumina/globulina nos cães considerados sem sinais clínicos foi considerada menor apenas em relação ao grupo controle. Diante disso, duas hipóteses são possíveis. A primeira é a de que a globulinemia destes cães tenha se elevado em razão da presença de outros fatores como infecções por *Babesia*, *Ehrlichia canis* ou alguma outra desordem que também cause disproteinemia canina (Shaw et al. 2001). A segunda hipótese é a de que a infecção por *L. infantum* seria a causa da alteração da globulinemia e que estes cães sem expressão clínica estivessem numa transição para o estado de doença.

Dos animais que compuseram as partes 2 e 3 deste trabalho, apenas 6 foram considerados sem expressão clínica da doença e por isso não houve separação de grupos segundo à presença ou ausência de sinais clínicos compatíveis à LVC. De acordo com

as análises bioquímicas, os cães das etapas 2 e 3 deste estudo não apresentaram evidências de anomalias renais quanto aos níveis séricos de creatinina e uréia, mas houve marcada redução dos níveis de albumina. Também houve aumento significativo dos níveis séricos de globulinas. Estes resultados, juntamente com a ocorrência de sinais clínicos físicos comuns nos casos de LVC, caracterizam a expressão clínica da doença.

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de amostras clínicas de coleta não invasiva para o diagnóstico da LVC por PCR. No total, foram analisados quatro tipos de amostras coletadas com *swab* devido à sua rapidez e praticidade para obtenção de material biológico. A LVC é uma doença sistêmica e a infecção pode se estabelecer em uma ampla variedade de órgãos e tecidos do hospedeiro (Ciaramella et al. 1997, Rallis et al. 2005, Adamama-Moraitou et al. 2007). Neste estudo, analisamos os *swabs* conjuntival, nasal e oral em função do interesse em se avaliar a detecção de DNA do parasito em mucosas, tecidos estes acometidos por processos patológicos devido à infecção por *L. infantum* (Koutinas et al. 1999, Blavier et al. 2001, Peña et al. 2008, Petanides et al. 2008).

Os *swabs* conjuntival e nasal foram coletados separadamente de ambos os olhos e narinas respectivamente, sendo cada qual uma amostra distinta. Porém, para a comparação das positivities destas amostras com as demais, foi utilizado o *swab* monolateral para evitar favorecimento desta amostra clínica. De modo geral, a PCR-hibridização apresentou elevadas positivities, sensibilidades e especificidade com o uso do *swab* conjuntival, demonstrando alto potencial diagnóstico para esta amostra clínica. Indiferentemente para cães com ou sem sinais clínicos, as positivities obtidas com o *swab* conjuntival foram altas, superando ou igualando-se estatisticamente aos resultados derivados de amostras clínicas de coleta invasiva como medula óssea e biópsia de pele de orelha. Isto, associado à facilidade de amostragem, torna o *swab* conjuntival uma alternativa muito atraente para o diagnóstico molecular da LVC especialmente em relação aos cães sem expressão clínica para os quais há reduzida sensibilidade de técnicas diagnósticas tradicionais e/ou de uso rotineiro (Nasereddin et al. 2006, Ferroglio et al. 2007, Moreira et al. 2007).

A especificidade obtida para PCR-hibridização com o *swab* conjuntival foi relativamente baixa apenas para os cães com expressão clínica. Neste caso, um número maior de cães negativos para mieloculutura foram positivos para a PCR-hibridização com *swab* conjuntival, o que reduziu a especificidade desta técnica. Este fato está mais associado a limitações da sensibilidade do teste parasitológico baseado em análise de

mieloculturas, o qual foi adotado como padrão ouro nas comparações. Diferentes estudos têm mostrado que técnicas parasitológicas não moleculares apresentam menor sensibilidade e, portanto, apresentam mais dificuldades para identificar a infecção canina por *L. infantum* (Strauss-Ayali et al. 2004, Chargui et al. 2007). No entanto, o método de mieloculturas foi adotado como padrão de referência por ser altamente específico e por apresentar sensibilidade superior aos testes parasitológicos baseados em análises citológicas e histopatológicas (Evans 1989, Rodríguez-Cortés et al. 2010).

Nas etapas experimentais seguintes (partes 2 e 3), o *swab* conjuntival foi submetido à cPCR juntamente com as demais amostras clínicas coletadas. Para esta técnica de PCR, a sensibilidade obtida com o *swab* conjuntival foi menor, evidenciando que a utilização de diferentes métodos de PCR pode interferir nos resultados (Pilatti et al. 2009). O índice de positividade obtido da associação da cPCR com o *swab* conjuntival foi equivalente àqueles referentes a todas as amostras de coleta não invasiva e à biópsia de orelha, sendo superado apenas pelo resultado de medula óssea. Adicionalmente, verificamos que a combinação das conjuntivas permitiu um incremento na positividade e, desta forma, se igualou estatisticamente ao resultado de medula óssea (dados não mostrados).

Comprovamos também um aumento na frequência do resultado positivo para o *swab* nasal ao se combinar as narinas. Este procedimento torna-se bastante recomendável para estudos de triagem diagnóstica em inquéritos caninos, pois, ao se associar as amostras, a probabilidade e a sensibilidade de detecção da infecção tornam-se maiores. Este fato foi corroborado em outros estudos com *swab* conjuntival, o que reforça a importância da combinação das oculares para o diagnóstico (Strauss-Ayali et al. 2004, Ferreira et al. 2008).

Diferentes estudos têm enfatizado o potencial do *swab* conjuntival para o diagnóstico molecular da LVC. Num estudo longitudinal em região endêmica, um método de *nested* PCR associado ao *swab* conjuntival foi avaliado e apontado como um possível marcador de exposição de cães a *Leishmania* (Gramiccia et al. 2010). Outros autores têm demonstrado, de forma preliminar, alta sensibilidade do *swab* conjuntival associado à PCR para o diagnóstico da LVC (Berrahal et al. 1996, Strauss-Ayali et al. 2004). Solano-Gallego et al. (2001a) utilizaram biópsia de conjuntiva e a submeteram à PCR para detecção de DNA de *L. infantum*. Seus resultados para esta amostra clínica apresentaram frequências de positividade mais elevadas do que aquelas obtidas para medula óssea. Consideramos que a coleta de amostra com o *swab* conjuntival apresenta

vantagens importantes, pois é não invasiva e permite a retirada de material de uma área maior da mucosa por meio do esfregaço do *swab* contra o tecido. Lombardo et al. (2011) destacou o desempenho do *swab* conjuntival associado à PCR, o qual foi similar ao de linfonodo, segundo estudo realizado em uma região endêmica da Itália. Neste caso, os autores detectaram DNA de *L. infantum* em *swab* conjuntival de 36 cães em um total de 163 animais. Nosso grupo de pesquisa vem estudando sistematicamente esta amostra clínica de coleta não invasiva sob diferentes contextos comparativos, levando-se em conta o status clínico de cães naturalmente infectados e comparando-a com diferentes amostras clínicas para o diagnóstico molecular da LVC em região endêmica brasileira (Ferreira et al. 2008, Pilatti et al. 2009, Leite et al. 2010).

Admite-se que o parasito se dissemine para as mucosas do cão por via sanguínea ou linfática (Reithinger et al. 2002b). Além disso, é razoável admitir que o parasito possa alcançar a conjuntiva e o focinho diretamente pela picada de flebotomíneos que têm preferência em se alimentar em regiões do cão desprovidas de pêlos (Di Muccio et al. 2008). Este fenômeno deve ocorrer com grande frequência especialmente em regiões endêmicas onde a densidade vetorial pode ser alta.

Na segunda etapa deste trabalho, observamos que o índice de positividade para o *swab* nasal foi elevado e estatisticamente equivalente ou superior aos resultados obtidos com as demais amostras clínicas. A sensibilidade calculada para o diagnóstico molecular com o *swab* nasal foi a segunda maior e próxima à primeira referente à medula óssea. Porém, sua especificidade foi baixa devido às mesmas razões discutidas para o uso do *swab* conjuntival em cães com expressão clínica. Embora o teste de mieloculturas seja muitas vezes eleito como método de referência nos estudos de acurácia diagnóstica, admite-se atualmente não existir um padrão ouro definitivo para o diagnóstico da LVC (Ferreira et al. 2007, Rodríguez-Cortés et al. 2010). O teste padrão a ser adotado pode variar de acordo com o foco investigativo do pesquisador e a escolha da técnica de referência deve ser orientada de acordo com o custo, operacionalidade, sensibilidade e especificidade envolvida (Rodríguez-Cortés et al. 2010).

A mucosa nasal tem sido relatada como um dos tecidos acometidos por processos inflamatórios e histopatológicos decorrentes da infecção por *L. infantum* em cães. Dentre as manifestações patológicas nasais destacam-se os granulomas, que podem ser piogênicos, e as lesões linfoplasmocitoides (Peña et al. 2008, Petanides et al. 2008). A detecção de DNA de *L. infantum* na mucosa nasal de boa parte dos cães analisados neste trabalho evidenciou a presença do parasito neste tecido. Isto é uma

evidência da efetiva colonização do parasito nesta região anatômica do cão. Particularmente em relação ao *swab* nasal, dados de espectrofotometria indicaram altas concentrações e pureza do DNA extraído (dados não mostrados). Este é um indicativo de que este tipo de amostragem permite a obtenção de um alto teor celular demonstrando ser essa amostra clínica uma rica fonte de material biológico para estudos moleculares.

Na terceira etapa deste estudo, embora com um tamanho amostral menor, a cPCR associada ao *swab* oral também apresentou alta positividade, resultado este que foi equivalente ou superior aos índices demonstrados com as outras amostras clínicas. Além disso, suas sensibilidade e especificidade foram igualmente altas. Este panorama evidencia que as amostras clínicas de coleta não invasiva a partir de mucosas avaliadas no presente trabalho são fortes candidatas para estudos mais amplos de triagem canina envolvendo diagnóstico molecular da LVC por PCR.

O *swab* oral foi avaliado pela primeira vez em uma região endêmica brasileira para o diagnóstico molecular da LVC. Esta amostra clínica foi objeto de estudo em uma região endêmica da Itália onde foram utilizados 163 cães (Lombardo et al. 2011). Estes autores observaram baixa positividade da PCR quantitativa associada ao *swab* oral uma vez que detectaram a infecção por *L. infantum* em apenas 8,7% da amostra total de animais e em 15% de cães considerados soropositivos.

Diferentes rotas para o acesso de *Leishmania* à mucosa oral são possíveis. Por exemplo, têm sido propostas algumas vias de entrada através de glândulas salivares, tecidos periodontais, gengivais, além de tecidos linfóides das tonsilas (Duncan et al. 2007).

Embora o *swab* oral tenha sido analisado dentro de um espaço amostral reduzido neste trabalho, seus resultados para o diagnóstico molecular por cPCR foram consideráveis e bastante promissores. Neste contexto, 22 de 28 cães tiveram a infecção por *L. infantum* confirmada utilizando-se esta amostra clínica mesmo em animais com a mucosa oral sem lesões evidentes. Estes resultados em conjunto levantam a suspeita da transmissão direta do parasito entre cães por meio de mordeduras e lambeduras, como já mencionado por Lombardo et al. (2011). Todavia, estudos mais profundos devem ser realizados para uma investigação mais rigorosa desta possibilidade. Até o momento, ela é apenas especulativa.

O *swab* da pele de orelha evidenciou maior limitação de acordo com seus resultados de positividade e sensibilidade para o diagnóstico molecular da LVC. A

frequência de resultado positivo para esta amostra foi superada por aqueles referentes às demais amostras clínicas com exceção do *swab* conjuntival e biópsia de pele de orelha, os quais apresentaram positivities estatisticamente equivalentes. Apesar de estas amostras terem sido comparadas dentro de um tamanho amostral reduzido, o desempenho similar do *swab* em relação à biópsia, ambos para pele de orelha, chama a atenção e demonstra o potencial daquela amostra de coleta não invasiva. Constatamos neste trabalho que a extração de DNA do *swab* da pele de orelha não foi eficiente, pois foram evidenciados baixos rendimento e pureza deste ácido nucléico. Segundo dados de espectrofotometria, houve indicativos da presença de resquícios protéicos nestas preparações de DNA (dados não mostrados). Isto provavelmente causou inibição da cPCR e reduziu acentuadamente sua positividade e sensibilidade. A especificidade da cPCR obtida com esta amostra foi máxima, o que, em princípio, torna esta metodologia compatível com testes parasitológicos não moleculares, também altamente específicos. Fica claro, portanto, que o uso do *swab* da pele de orelha deve ser mais estudado e aperfeiçoado para fins diagnósticos da LVC.

A medula óssea é um tecido extensivamente utilizado nos estudos de LVC, visto que é muito colonizado por *L. infantum* devido ao seu tropismo para os tecidos linfóides. Devido a isso, altas sensibilidades da PCR são recorrentemente reportadas para a medula óssea a qual é uma importante fonte de parasitos para testes parasitológicos convencionais e moleculares (Maia et al. 2009, Quaresma et al. 2009). Na primeira etapa deste trabalho, a positividade e sensibilidade da PCR-hibridização para medula óssea foram significativamente maiores nos cães com sinais clínicos da LVC. Aspecto semelhante foi corroborado com os resultados para biópsia de pele de orelha. Isso evidenciou uma marcada redução de sensibilidade para detecção da infecção em animais sem expressão clínica da doença. A dificuldade em se diagnosticar a infecção em cães sem manifestações clínicas de forma acurada tem sido uma grande preocupação para as campanhas de controle e ainda permanece como um desafio para o diagnóstico correto da LVC (Quinnell et al. 2001, Mettler et al. 2005, Porrozzi et al. 2007).

Os resultados para medula óssea foram mais expressivos utilizando-se a cPCR. Neste caso, a positividade sofreu um importante incremento assim como ocorreu para pele de orelha. No caso da medula óssea, a sensibilidade obtida com a cPCR foi a mais alta, o que está de acordo com referências na literatura que indicam estar esta amostra

dentre aquelas que permitem maior sensibilidade para o diagnóstico da LVC por PCR (Maia et al. 2009, Quaresma et al. 2009).

É importante lembrar que a coleta de aspirados medulares é invasiva e mais traumática aos animais. Ela exige a sedação do cão e normalmente resulta em resistência dos donos em cederem seus animais para realização de exames que envolvam este material biológico. Por isso, o uso de medula óssea apresenta obstáculos para estudos clínicos e epidemiológicos em maior escala.

A pele foi incluída neste estudo devido a sua importância epidemiológica na transmissão da LVC, pois representa a principal via de acesso para o repasto sanguíneo de flebotômicos. Diferentes estudos com esta amostra clínica de cães evidenciaram altos índices de positividade para o diagnóstico molecular (Manna et al. 2004, Queiroz et al. 2011). Xavier et al. (2006) avaliaram diferentes técnicas de diagnóstico a partir de biópsias de pele de distintas regiões anatômicas em cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Estes pesquisadores concluíram que a combinação da PCR com a pele da orelha apresentou o melhor desempenho, sendo por isso, indicada para o diagnóstico molecular da LVC. A detecção de amastigotas tem sido correlacionada com regiões de alta irrigação sanguínea no cão e a pele de orelha é apontada como de alta susceptibilidade à infecção via flebotômicos (Travi et al. 2001).

Em nosso estudo, a face interna da pele de orelha foi escolhida para coleta, pois é normalmente desprovida de pêlos e a retirada de material é relativamente simples. No entanto, deve-se frisar que a biópsia de pele é uma forma invasiva de coleta, geralmente dolorosa e sanguinolenta, exigindo anestesia e assepsia local para retirada de material.

O sangue periférico é de obtenção mais fácil em relação à medula óssea e a biópsias de pele, e sua coleta é considerada por alguns autores como menos invasiva (Strauss-Ayali et al. 2004). No entanto, nossos resultados de diagnóstico molecular para o sangue apresentaram as menores positividade e sensibilidade indiferentemente do grupo de cães em que esta amostra foi testada. Há resultados conflituosos na literatura acerca do desempenho da PCR realizada a partir de sangue periférico, de modo que alguns estudos demonstraram ter esta técnica alta sensibilidade (Fisa et al. 2001, Lachaud et al. 2002a, Manna et al. 2004), ao passo que outros autores evidenciaram o contrário (Reale et al. 1999, Silva et al. 2001b). Em nosso contexto experimental, a PCR-hibridização apresentou baixa eficiência utilizando-se sangue canino como fonte de DNA de *Leishmania*. É sabido que a carga parasitária sanguínea varia ao longo do tempo e resultados falsos negativos podem ser obtidos caso a coleta seja feita em

períodos nos quais a carga esteja baixa (Strauss-Ayali et al. 2004). Esta é uma dificuldade para a detecção de *Leishmania* em sangue canino, e a dinâmica, duração e a constância da carga parasitária sanguínea ainda permanecem pouco conhecidas (Lachaud et al. 2002b, Nasereddin et al. 2006). Além disso, o sangue apresenta inibidores de PCR como a hemoglobina, o que pode ter afetado nossos resultados. Particularmente em relação aos produtos de PCR derivados desta amostra clínica, observamos inúmeras bandas espúrias nos géis de eletroforese. Isto envolve maior competição pelos iniciadores e diminui a eficiência da PCR. Devido a estas limitações e à intermitência da carga parasitária sanguínea ao longo do tempo, o sangue periférico não foi utilizado para a realização da PCR em tempo real (qPCR).

Com já discutido anteriormente, observamos que diferentes amostras clínicas com as maiores sensibilidades para o diagnóstico molecular tiveram, em contrapartida, menores especificidades. Ao contrário, as maiores especificidades foram obtidas juntamente com sensibilidades reduzidas. As amostras clínicas de coleta não invasiva permitiram a obtenção de altas sensibilidades, com exceção do *swab* da pele de orelha. Isto mostra um potencial importante para o uso destas amostras como um recurso auxiliar para o diagnóstico molecular da LVC enquanto procedimento preliminar para triagem de cães. Destaques são dados ao *swab* conjuntival em cães sem sinais clínicos e ao *swab* oral cujas reações de PCR-hibridização e cPCR, respectivamente, apresentaram altas sensibilidade e especificidade.

Tornou-se claro neste trabalho que o uso de diferentes métodos de PCR convencional implica em diferentes resultados diagnósticos da LVC para uma mesma amostra clínica. Neste estudo, utilizamos as técnicas de PCR-hibridização e PCR complexo *L. donovani* específica (cPCR), ambas com iniciadores endereçados para a região conservada de minicírculo de kDNA. Embora estes ensaios tenham sido realizados em contextos experimentais diferentes e com tamanhos amostrais distintos, é fato conhecido que diferentes métodos de PCR podem apresentar diferentes sensibilidades para o diagnóstico (Lachaud et al. 2002b, Carson et al. 2010). Em trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa, comparamos quatro métodos de PCR incluindo a PCR-hibridização e variações de *nested* PCR para o diagnóstico molecular da LVC utilizando-se o *swab* conjuntival (Pilatti et al. 2009). Neste caso, verificamos que a PCR-hibridização foi mais robusta por ter apresentado maior sensibilidade, além de permitir a diferenciação entre *L. infantum* e *L. braziliensis*. A hibridização é uma etapa adicional que aumenta a sensibilidade da PCR e confirma seus resultados

(Degrave et al. 1994, Reithinger et al. 2000, Headington et al. 2002, Ferreira et al. 2008). Por isso, esta metodologia foi utilizada na presente pesquisa. Porém, sua desvantagem reside no fato de exigir infraestrutura mais elaborada para proteção radiológica, uma vez que envolve o uso de radioisótopos.

A utilização da cPCR para diagnóstico da LVC a partir das amostras clínicas de coleta não invasiva adotadas neste trabalho ainda não havia sido avaliada. Este método molecular apresenta vantagens, pois envolve uma única etapa, dispensa uso de radionuclídeos bem como de amplificações sequenciais (*nested*), o que diminui as chances de contaminação. Por essas razões, escolhemos utilizar a cPCR na segunda e terceira etapa experimental deste estudo. De forma geral, o tipo de PCR a ser escolhido depende da informação que se quer obter com o diagnóstico e da infraestrutura laboratorial disponível (Pilatti et al. 2009, Rocha et al. 2010).

A carga parasitária também foi averiguada nas diferentes amostras clínicas utilizadas neste trabalho, exceto no sangue periférico. Na primeira parte deste estudo, demonstramos que o *swab* conjuntival e medula óssea mostraram maiores cargas parasitárias em cães com sinais clínicos em relação a estas respectivas amostras em cães sem expressão clínica. Isto está de acordo com diversos autores que verificaram reiteradamente ser o alto parasitismo uma das características marcantes de cães naturalmente infectados com manifestações clínicas da LVC (Giunchetti et al. 2006, Reis et al. 2006b, Giunchetti et al. 2008). Em nosso trabalho, as cargas parasitárias obtidas para pele de orelha foram mais altas do que as demais amostras clínicas em ambos os grupos de cães, com e sem sinais clínicos, infectados por *L. infantum*. Além disso, as cargas para pele foram estatisticamente equivalentes quando comparadas entre os dois grupos. Inesperadamente, a positividade da PCR convencional, especialmente da PCR-hibridização, foi baixa para pele de orelha. Possivelmente, isto está relacionado ao fato de que a quantidade de DNA utilizada para a PCR convencional não foi controlada. Ao contrário, a concentração de DNA foi normalizada para a realização da qPCR.

A pele intacta de orelha de cão foi considerada como um dos principais alvos para detecção e confirmação parasitológica da LVC (Madeira et al. 2009b). Manna et al. (2006) acompanharam a infecção em cães sem sinais clínicos infectados por *L. infantum* e verificaram que o parasitismo na pele destes animais se apresentou maior do que o de linfonodo utilizando a qPCR. Ainda, comprovaram que a carga parasitária cutânea permaneceu alta nestes animais por seis meses. Reis et al. (2006a) utilizaram a técnica de *Leishman Donovan Units* (LDU) para estimar a carga parasitária em diferentes

amostras clínicas em cães naturalmente infectados. Nesse caso, um número maior de parasitos foi detectado na pele, quando comparada à medula óssea. Em outro trabalho, foi demonstrado que a densidade parasitária em macrófagos foi equivalente na pele de cães com e sem sinais clínicos provenientes da região amazônica brasileira, utilizando-se o método de imunohistoquímica (Lima et al. 2010). Todavia, estes últimos autores confrontaram 51 cães doentes com apenas 9 cães sem manifestações clínicas para a LVC.

Nossos resultados estão de acordo com estes trabalhos, com o diferencial de que cães sem expressão clínica compatível à LVC apresentaram cargas parasitárias na pele similares àquelas dos cães com manifestações clínicas, utilizando-se a qPCR com tamanhos amostrais maiores e equivalentes entre si. Este dado enfatiza a importância dos cães como reservatórios e como um elo fundamental para a cadeia de transmissão da LVC, especialmente aqueles sem sinais clínicos, uma vez que a pele do cão é normalmente o primeiro ponto de contato com os flebotomíneos (Berrahal et al. 1996, Solano-Gallego et al. 2001a).

A infecção experimental de flebotomíneos foi demonstrada por xenodiagnóstico a partir de cães infectados sem expressão clínica utilizando-se *Lutzomyia longipalpis* (Costa-Val et al. 2007) e *Phlebotomus perniciosus* (Molina et al. 1994). Isto impõe um grande desafio para o controle da LVC em regiões endêmicas. É importante lembrar que os testes sorológicos realizados em larga escala para triagem canina no Brasil apresentam problemas para a identificação de cães com infecção subclínica (Ferreira et al. 2007). Além disso, é comum ocorrerem atrasos para a eutanásia de cães confirmadamente infectados, o que mantém estes animais como fonte de infecção para flebotomíneos por mais tempo (Courtenay et al. 2002). Estes fatores associados ao alto parasitismo cutâneo dos cães podem contribuir sensivelmente para a manutenção de altas taxas de prevalência e transmissão da LVC em locais como Belo Horizonte e possivelmente em outras cidades brasileiras e regiões endêmicas do mundo.

Neste estudo, observamos que as cargas parasitárias nas mucosas dos cães foram mais baixas. De forma similar, reduzidas quantidades de amastigotas foram detectadas por qPCR em *swab* conjuntival de cães infectados mesmo quando combinadas ambas oculares, reforçando ser baixa a carga parasitária da mucosa conjuntival (Galletti et al. 2011). O baixo parasitismo nas mucosas foi inesperado uma vez que a positividade da PCR convencional para estes tecidos foi alta. No entanto, a característica do resultado dos diferentes ensaios de PCR utilizados neste estudo é diferente. Neste sentido, a PCR

convencional demonstrou apenas a presença ou ausência do DNA do parasito enquanto a qPCR evidenciou uma estimativa quantitativa do número de amastigotas por células caninas. Além disso, admite-se que a qPCR tenha condições de termociclagem mais precisas e maior sensibilidade de detecção do que os métodos moleculares convencionais (Bell and Ranford-Cartwright 2002; Francino et al. 2006).

Na segunda e terceira etapa deste trabalho, as cargas obtidas para medula óssea foram tão altas quanto às da pele de orelha. Este resultado corrobora ser a medula óssea um tecido rico em amastigotas e por isso tem sido muitas vezes utilizado como amostra de escolha para a confirmação da infecção canina por *L. infantum* (Solano-Gallego et al. 2007, Carson et al. 2010).

Pela primeira vez, a carga parasitária em cães infectados por *L. infantum* foi estimada para os *swabs* nasal e da pele de orelha. Embora Lombardo et al. (2011) tenham sido pioneiros ao demonstrarem o *swab* oral como fonte de DNA de *L. infantum* em cães utilizando a qPCR, o enfoque destes autores foi dado ao diagnóstico qualitativo e as cargas parasitárias não foram demonstradas.

Em nosso estudo, as cargas parasitárias destas amostras clínicas de coleta não invasiva foram analisadas simultaneamente num contexto comparativo. Este trabalho abre uma importante perspectiva para pesquisas mais profundas que possam esclarecer melhor as aplicações destas amostras clínicas, tanto para a PCR convencional quanto para a qPCR em estudos sobre a LVC. Nossos resultados evidenciaram um grande potencial destas amostras clínicas, pois elas demonstraram desempenho superior ou equivalente ao de amostras de obtenção invasiva para o diagnóstico qualitativo. A utilização do *swab* para coleta de material biológico é bastante atraente, pois é praticamente indolor, simples, rápida e não invasiva. Apesar de o *swab* de orelha ter apresentado baixo desempenho, acreditamos ser ele passível de aperfeiçoamento, especialmente em relação à extração do DNA. A partir disso, esta amostra clínica poderia ser uma promissora alternativa às biópsias cutâneas para coleta de material destinado à PCR.

A comparação de diferentes amostras clínicas para a detecção de DNA de *Leishmania* é relevante, pois a distribuição do parasito nos diferentes tecidos hospedeiros não é uniforme (Reis et al. 2006a). Portanto, a avaliação do diagnóstico molecular a partir de diferentes regiões anatômicas de coleta contribui para uma escolha criteriosa da amostra clínica mais adequada a ser utilizada em maior escala.

Outro precedente importante deste trabalho é a possibilidade do uso de *swabs* para coleta de material biológico em humanos para fins de diagnóstico das leishmanioses. Em um estudo realizado no Equador, 15 de 16 pacientes tiveram diagnóstico por PCR positivo para a leishmaniose cutânea utilizando-se *swab* para coleta de exsudato em lesões de pele (Mimori et al. 2002). Neste caso, o uso do *swab* foi indicado pelos autores como um possível substituto de biópsias. Na Colômbia, Figueroa et al. (2009) conseguiram diagnosticar leishmaniose cutânea em pacientes utilizando PCR a partir dos *swabs* conjuntival e nasal. Na Índia, foi detectada uma alta proporção de pacientes com LV utilizando-se o diagnóstico molecular a partir dos *swabs* oral e conjuntival (Vaish et al. 2011). Estes exemplos ilustram o potencial destas amostras de coleta não invasiva para o uso em humanos e poderiam ser testadas em regiões endêmicas brasileiras.

No presente trabalho, também analisamos a correlação entre os títulos de IgG total e a carga parasitária em diferentes amostras clínicas de cães com e sem sinais clínicos para a LVC. A investigação das relações da produção de IgG e de suas subclasses com a evolução da LV e com o status clínico de cães infectados por *L. infantum* vem adquirindo grande relevância (Reis et al. 2009). Estudos sobre estes aspectos são estratégicos, pois um melhor conhecimento dos princípios que regem a dinâmica da infecção e da doença nos cães é fundamental para o aperfeiçoamento do diagnóstico e do tratamento da LVC.

Na primeira parte de nosso estudo, os títulos de IgG total foram medidos para cada cão naturalmente infectado e confrontados com sua respectiva carga parasitária em diferentes amostras clínicas. Porém, não detectamos associação entre a carga parasitária e títulos de IgG em nenhuma amostra de coleta não invasiva independentemente do status clínico dos cães. O mesmo resultado foi obtido quando analisamos os dados de medula óssea e pele de orelha para os cães com expressão clínica. Estes dados sugerem que a carga parasitária parece não ter qualquer influência sobre a gamaglobulinemia.

Muitos autores tem se dedicado ao estudo das subclasses IgG1 e IgG2 como possíveis indicadores do status clínico de cães e do prognóstico da LVC. Neste contexto, os resultados publicados são ainda controversos. Alguns estudos demonstraram haver uma relação direta entre altos níveis de IgG1 e a presença de sinais clínicos em cães infectados por *L. infantum* e, por outro lado, evidenciaram correlação direta entre alta produção de IgG2 e ausência de manifestações clínicas nestes hospedeiros (Deplazes et al. 1995, Nieto et al. 1999, Solano-Gallego et al. 2001b,

Quinnell et al. 2003a, Iniesta et al. 2005). No entanto, outros autores mostraram uma relação inversa entre estas imunoglobulinas e o quadro clínico canino (Leandro et al. 2001, Reis et al. 2006b, Costa-Val et al. 2007, Freitas et al. 2012).

É importante mencionar que em grande parte destes trabalhos utilizou-se a técnica de ELISA para avaliação dos níveis de IgG por meio de leituras de absorbância. Neste caso, os resultados desta técnica são influenciados pela temperatura e tempo de incubação da placa, além da concentração da peroxidase ligada ao conjugado. A combinação destes fatores se torna uma variável que pode influenciar nos valores de absorbância fazendo com que os níveis de diferentes subclasses de IgG não sejam diretamente comparáveis (Alves et al. 2009b). Este dado possivelmente está relacionado ao fato de que as absorbâncias obtidas com a técnica de ELISA foram equivalentes entre os grupos de cães com e sem expressão clínica da LVC no presente trabalho.

Em nosso estudo, utilizamos a técnica de RIFI para medir os títulos de IgG total, o que não leva em conta as variações das medidas de absorbância. Neste caso, verificamos a presença de correlação positiva e significativa entre os níveis de IgG e o parasitismo de cães sem manifestações clínicas apenas quando a medula óssea e a pele de orelha foram consideradas. A presença de associação entre a carga parasitária e os títulos de IgG em apenas alguns tecidos do cão infectado pode estar relacionada a diferentes padrões de resposta imune nos diferentes órgãos ou tecidos do hospedeiro, os quais devem influenciar diferentemente o parasitismo. De fato, tem sido comprovado que os microambientes dos órgãos caninos densamente parasitados por *L. infantum* apresentam diferentes padrões de resposta imune, o que está intimamente relacionado a distintas interações parasito-hospedeiro (Alves et al. 2009b).

Embora não possamos fazer inferências diretas a partir dos resultados de associações significativas, eles abrem um precedente importante para investigar se há realmente uma relação causal entre o aumento de carga parasitária em tecidos altamente colonizados pelo parasito e o incremento dos níveis de IgG anti*Leishmania* em cães sem sinais clínicos. Além disso, não se pode descartar a hipótese de que estes cães estivessem num processo de transição para uma fase de estabelecimento da LVC ou da doença propriamente dita. Junto a isso, surge a necessidade de elucidar os processos pelos quais o cão infectado sem expressão clínica passa ao estado de doente.

De modo geral, o aumento da gamaglobulinemia nos cães infectados está associado à patogenia da LVC, uma vez que daí decorre a formação e acumulação de imunocomplexos responsáveis por diversos processos patológicos no hospedeiro

(Giunchetti et al. 2006, Plevraki et al. 2006, Giunchetti et al. 2008). Nossos dados de RIFI estão de acordo com esta premissa uma vez que os cães com expressão clínica da LVC apresentaram maiores títulos de anticorpos do que os cães considerados sem manifestações clínicas. Em relação aos nossos resultados de correlação entre os parasitismos cutâneo e medular e os títulos de IgG anti-*Leishmania* nos cães sem sinais clínicos, fica o ensejo para investigações mais acuradas sobre a possibilidade de haver uma gradação dessas variáveis que esteja relacionada à evolução da LVC.

Com base em tudo o que foi discutido, fica claro que o diagnóstico molecular associado a amostras clínicas de coleta não invasiva tem grande potencial de aplicabilidade na triagem de cães. Além disso, o desempenho verificado destas amostras também abrem perspectivas para o uso em humanos. O presente trabalho pode ser considerado como um subsídio para a realização de estudos de campo em maior escala com a finalidade de verificar a validade destas amostras obtidas por meio de *swabs* para o diagnóstico da LV num contexto epidemiológico. Atualmente, um estudo mais amplo envolvendo inquéritos de cães domiciliados está sendo realizado por nosso grupo de pesquisa com o objetivo de averiguar o desempenho do *swab* conjuntival para o diagnóstico molecular da LVC em maior escala.

Em suma, os espécimes clínicos avaliados neste estudo podem ser um recurso auxiliar importante para o diagnóstico da LVC e vir a ser parte do repertório de opções a serem escolhidas para esta finalidade.

CONCLUSÕES

7) CONCLUSÕES

- O *swab* conjuntival associado à PCR-hibridização apresentou alto potencial para a detecção de *L. infantum*, ao demonstrar alta positividade, sensibilidade e/ou especificidade em cães com e sem sinais clínicos compatíveis à LV;
- O desempenho do *swab* conjuntival para a detecção de *L. infantum*, segundo a PCR-hibridização, foi expressivo, pois superou ou foi equivalente àquele apresentado por amostras clínicas de coleta invasiva como medula óssea, pele de orelha e sangue periférico, independentemente do status clínico dos cães naturalmente infectados;
- A utilização de medula óssea e pele de orelha associadas à PCR-hibridização se mostrou limitada para a detecção do parasito em cães sem sinais clínicos da LV;
- O sangue periférico apresentou a menor eficiência para o diagnóstico molecular da LVC indiferentemente do status clínico dos cães naturalmente infectados por *L. infantum*;
- A pele de orelha apresentou a maior carga parasitária independentemente do status clínico dos cães naturalmente infectados;
- Os níveis de parasitismo detectados na medula óssea e *swab* conjuntival em cães com manifestações clínicas foram consideravelmente maiores em relação às cargas parasitárias obtidas nestas respectivas amostras em cães sem sinais clínicos;
- Os títulos de IgG anti*Leishmania* foram significativamente mais elevados nos cães naturalmente infectados com expressão clínica;
- Correlações positivas e significativas foram obtidas entre o nível de IgG total anti*Leishmania* e a carga parasitária em cães sem manifestações clínicas apenas quando medula óssea e pele de orelha foram consideradas;

- O *swab* nasal associado à cPCR apresentou alto potencial para a detecção de *L. infantum* ao demonstrar altas positividade e sensibilidade, e por apresentar desempenho equivalente àquele demonstrado por amostras clínicas de coleta invasiva como medula óssea e pele de orelha;
- O *swab* oral associado à cPCR apresentou alto potencial diagnóstico ao demonstrar altas positividade, sensibilidade e especificidade, além de exibir desempenho equivalente àquele demonstrado por medula óssea e biópsia de pele de orelha;
- Nas etapas 2 e 3 deste estudo, a medula óssea e a pele de orelha foram os tecidos mais parasitados segundo o método de qPCR;
- As cargas parasitárias estimadas nas mucosas conjuntival, nasal e oral foram as mais baixas;
- O *swab* da pele de orelha apresentou baixa eficiência para o diagnóstico molecular da LVC;
- Dentro deste contexto experimental, os *swabs* conjuntival e nasal foram as amostras clínicas mais adequadas para o diagnóstico molecular da LVC utilizando-se a PCR-hibridização e a cPCR respectivamente

PERSPECTIVAS

8) PERSPECTIVAS

Os resultados da presente pesquisa naturalmente abrem precedentes para novos estudos mais aprofundados. Dentre os possíveis encaminhamentos deste trabalho, destacam-se:

- ✓ Avaliar o desempenho dos *swabs* conjuntival, nasal e oral em larga escala sob o contexto epidemiológico para o diagnóstico molecular da LVC;
- ✓ Aperfeiçoar o processo de extração de DNA do *swab* da pele de orelha com a finalidade de avaliar seu potencial para o diagnóstico molecular da LVC e para a estimativa de carga parasitária por qPCR;
- ✓ Investigar as possíveis causas das associações entre os títulos de IgG anti*Leishmania* e a carga parasitária na pele de orelha e medula óssea de cães naturalmente infectados sem sinais clínicos.

ANEXOS

ANEXO 1 - Pareceres do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 183/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Comparação do swab conjuntival com diferentes amostras clínicas utilizadas para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina por PCR**", que tem como responsável(is) **Maria Norma Melo**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **4/03/2009**.

Este certificado expira-se em **4/03/2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 183/2008**, related to the project entitled "**Comparison of conjunctival swab with different clinical samples used to the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by PCR**", under the supervisors of **Maria Norma Melo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 4, 2009**.

This certificate expires in **March 4, 2014**.

Belo Horizonte, 10 de Março de 2009.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 -- Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@nppq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)



**Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Experimentação Animal - CETEA**

OF. CETEA-020/10

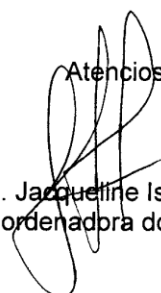
Belo Horizonte, 5 de agosto de 2010.

Ilma. Sra.
Profa. Maria Norma Melo
Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biológicas
Nesta

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG informa que na reunião do dia 24/03/2010, em face da justificativa apresentada por V. Sa., aprovou o pedido de inclusão de 30 animais por grupo ao projeto protocolado sob o número 183/2008, sobre "*Comparação do swab conjuntival com diferentes amostras clínicas utilizadas para o diagnóstico de Leishmaniose visceral canina por PCR*".

Sendo o que nos apresenta no momento, ficamos à sua inteira disposição para outros esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente


Profa. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

O CETEA tem novo site: <http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/>.

E-mail : cetea@prpq.ufmg.br

Endereço: *Unidade Administrativa II, 2º. andar, sala 2005.*

Tel. 3409-4516, Fax: 3409-4592

ANEXO 2 – Publicações

ARTIGO 1

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples

Rodrigo Souza Leite^a, Sidney de Almeida Ferreira^a, Leonardo Trindade Ituassu^b, Maria Norma de Melo^b, Antero Silva Ribeiro de Andrade^{a,*}

^a Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), Rua Professor Mário Werneck S/N°, Cidade Universitária–Campus da UFMG, 31120-970, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, Departamento de Parasitologia, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2009
Received in revised form 14 January 2010
Accepted 13 February 2010

Keywords:

Visceral leishmaniasis
Dog
Diagnosis
PCR
Conjunctival swab

ABSTRACT

The efficacy of conjunctival swab (CS) as a sampling method for visceral leishmaniasis (VL) diagnosis by PCR of asymptomatic dogs was evaluated. The CS was compared to blood samples (B) and skin biopsies (SB), two less invasive samples potentially useful for massive screening of dogs. Thirty asymptomatic dogs, with serological and parasitological positive tests, were used. The samples were analyzed by two PCR methods: kDNA PCR-hybridization and ITS-1 nPCR. The DNA sample volume used was of 1.0 μL and 10.0 μL respectively. Using CS samples the kDNA PCR-hybridization was able to detect parasite DNA in 24/30 dogs (80%) using the right conjunctiva (RC) and 23/30 dogs (76.6%) with the left conjunctiva (LC), 17/30 dogs (56.7%) by means of SB and 4/30 dogs (13.3%) with B. The CS positivity obtained combining RC and LC results was of 90% (27/30 dogs). The assay of CS samples by ITS-1 nPCR revealed that 25/30 dogs (83.3%) were positive when using RC and 20/30 dogs (66.6%) were positive when using LC. Via the same method 15/30 dogs (50.0%) were positive by SB and 17/30 dogs (56.7%) with B. The CS positivity obtained by ITS-1 nPCR combining RC and LC was of 83.3%. The CS positivities for RC and LC were significantly higher ($p < 0.05$) than SB and B for kDNA PCR-hybridization method. Statistical difference in relation to SB and B was verified by ITS-1 nPCR only for RC. The kDNA PCR-hybridization and ITS-1 nPCR methods showed similar sensitivities for CS and SB samples. On the other hand, for blood samples, the positivity of ITS-1 nPCR was significantly higher than the one obtained by the kDNA PCR-hybridization, indicating that sensitivity of PCR methods can vary according to the biological sample examined. Our results showed that CS was suitable to detect *Leishmania* DNA in asymptomatic animals when comparing to other low-invasive samples. The CS sensitivities obtained in this study were similar to the ones observed in other studies for VL diagnosis in symptomatic dogs. We concluded that the use of CS for regular screenings of dogs by PCR should be considered.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmania (leishmania) chagasi (syn. *Leishmania (Leishmania) infantum*) is the etiologic agent of visceral leishmaniasis (VL) in Brazil and dogs are the major domestic reservoir of the parasite (Laison and Shaw, 1987). The VL epidemiological control in Brazil involves the elimination of infected dogs, insecticide treatment and systematic

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3069 3182; fax: +55 31 3069 3380.
E-mail addresses: rleite2005@gmail.com (R.S. Leite),
vidasnino@yahoo.com.br (S.d.A. Ferreira), ltuassu@yahoo.com.br
(L.T. Ituassu), melo@mono.icb.ufmg.br (M.N. de Melo),
antero@cdtn.br (A.S.R. de Andrade).

treatment of human cases (Tesh, 1995). Reliable diagnostic tests for detection of *Leishmania* infection are essential to avoid the disease transmission or the unnecessary culling of dogs. The Brazilian VL control program emphasizes serologic surveys, mainly using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the immunofluorescence antibody test (IFAT), followed by the elimination of the seropositive dogs. However, these techniques present limitations in terms of reproducibility and specificity (Silva et al., 2006). Sometimes they fail due to the low level of specific antibodies in some dogs and cross-reactivities with Chagas's disease, rickettsiosis, ehrlichiosis and toxoplasmosis (Barbosa de Deus et al., 2002). In addition, symptomatic dogs usually produce high levels of specific antibodies which can be easily detected (Deplases et al., 1995), but the sensitivity of antibody detection is generally lower in early or in asymptomatic canine infections (Leontides et al., 2002). Asymptomatic animals may represent a high percentage (up to 85%) of infected dogs in areas of endemicity (Dantas-Torres et al., 2006) and they serve as reservoir for vector transmission to susceptible animals and humans (Michalsky et al., 2007).

PCR assays have greatly improved the sensitivity of VL diagnosis in dogs (Maia and Campino, 2008). Various canine tissues (including blood, skin biopsies, lymph node, bone marrow and spleen) have been used for PCR detection of the parasite. However, the non-invasive samples assume great importance in this context because they are simpler, painless and more easily allowed by the dog-owners. Non-invasive samplings would represent an essential tool in mass-screening survey for interventional programs. An interesting approach in this context is the conjunctival swab (CS), a method for sample collection that uses a sterile swab for sampling the dog conjunctivas. This method was shown to be highly sensitive when used for diagnosis of symptomatic dogs (Strauss-Ayali et al., 2004; Ferreira et al., 2008; Pilatti et al., 2009). The aim of the present study was to evaluate the canine VL diagnosis by PCR using conjunctival swab from asymptomatic dogs.

2. Material and methods

2.1. Dogs

Thirty mongrel dogs, designated to compulsory euthanasia, were donated by the Municipal Zoonotic Diseases Control Department of Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. The dogs were simultaneously positive for ELISA and IFAT. All dogs were asymptomatic and positive in the parasitological diagnosis. Six healthy serum negative dogs (from a non-endemic area) were used as negative controls. This study was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (CETEA/UFMG) protocol number 183/2008.

2.2. Samples

Exfoliative epithelial cells were collected from the right (RC) and left (LC) conjunctiva of each animal using sterile cotton swabs manufactured for bacteriological isolation. Each sample was analyzed separately to provide a repli-

cate diagnosis for each animal. The cotton tips were broken and only the cotton parts were transferred to sterile tubes and stored at -20°C until use. Peripheral blood (2.7 mL) (B) was collected from each dog in tubes containing EDTA, kept in ice and processed as soon as possible. Skin biopsies (SB) were collected from the internal side of the ear using a 5 mm diameter punch. The biopsies, weighing approximately 15.0 mg were stored at -20°C until processed. Bone marrow aspirates were obtained in a sterile manner using a thin biopsy needle, kept at 4°C and used in the following 24 h for parasitological diagnosis.

2.3. DNA extraction

The DNA purification from CS was carried out as described by Strauss-Ayali (2004), with minor modifications. Each cotton received 300 μL of lysis buffer (50 mMol/L Tris, 50 mMol/L NaCl, and 10 mMol/L EDTA, pH 8.0) containing proteinase K (250 (g/mL) and Triton X-100 (1%). After the incubation (2 h at 56°C) the solution was eluted from the cotton, transferred into phase-lock gel tube PLG-H (Eppendorf) and was mixed with 500 μL of 75% Tris-saturated phenol (Sigma), 25% chloroform-isoamyl alcohol. The organic phase was separated from the aqueous phase by centrifugation at $12,000 \times g$ for 5 min which was transferred to a new phase-lock gel tube PLG-H. The extraction was repeated with 500 μL of 50% phenol, 50% chloroform-isoamyl alcohol and once with 100% chloroform-isoamyl alcohol. The DNA precipitation was done with one volume of isopropanol-sodium acetate, followed by wash with 75% ethanol. The DNA pellet was suspended in 30 μL of Tris-EDTA buffer (10 mMol/L Tris and 1 mMol/L EDTA, pH 8.0) and was kept at -20°C until being used.

The DNA extraction from 1.0 mL of whole blood (B) and skin biopsies (SB) were performed using the commercial kits illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) and Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega), respectively, according to the manufacturer's protocol. The purified DNA, 80 μL and 160 μL respectively, was stored at -20°C .

2.4. PCR

The samples were analyzed by two PCR protocols: kDNA PCR-hybridization and internal transcribed spacer 1 nested PCR (ITS-1 nPCR). Positive control with *L. (L.) chagasi* (strain MHOM/1973/BH46) genomic DNA was used at 1.0 ng/ μL . A negative control without DNA was included in all tests. The DNA sample volume used for kDNA PCR-hybridization was of 1.0 μL and for the ITS-1 nPCR was of 10.0 μL .

2.4.1. kDNA PCR-hybridization

The PCR reaction mixture contained 0.2 mM of each dNTP, 0.2 nMol of each primer [5'-(G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACAACCCC-3' and 5'-GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3'], 2.5 U of AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems), 2.5 μL of 10X buffer (Tris-HCl 50 mM, [pH 8.3], KCl 50 mM), 2.0 mM MgCl_2 in a final volume of 50 μL . The amplifying conditions were: initial denaturation at 95°C for 15 min, 30 cycles including 94°C at 30 s, 50°C at 30 s, 72°C at 30 s, and a final extension at

72 °C for 10 min. All amplification products were analyzed on 2% agarose gel and were stained with ethidium bromide. The target for amplification was a 120 base pairs (bp) sequence of *Leishmania* kDNA minicircle conserved region (Degrave et al., 1994).

For the hybridization step 10.0 µL of each amplification product was mixed to 110.0 µL of NaOH 0.4 M, EDTA 25 mM [pH 8.0] solution and spotted on nylon membrane (Hybond-XL Amersham) using a Bio Dot apparatus (Hybridot manifold-BRL®). After that, the membrane was rinsed with 2× SSC (0.3 M NaCl, 0.3 mM sodium citrate) and dried. The DNA was fixed to the filter by UV light (0.12 J/cm²). Cloned kDNA minicircles from *L. (L.) chagasi* were used as probes. The probe was labeled with ³²P[α]dCTP using the Random Primer DNA Labeling System® (Invitrogen). Hybridization conditions were as previously described (Andrade et al., 2001). Briefly, the filters were pre-soaked at 58 °C for 30 min in 0.5% non-fat milk, 1% sodium dodecyl sulphate (SDS) and 2× SSC solution. The kDNA probe was added to the solution after being heated for 3 min in a boiling water bath. The filters were incubated for 14 h at 58 °C, with shaking, then placed in 2× SSC at room temperature for 20 min and washed in 0.5× SSC, 0.5× SDS, at 65 °C for 30 min. Finally, it was dried and exposed in the cassette (BAS 2325 Fujifilm) for 2 h. The image was obtained using a Bio-Imaging Analyzer® (Fujifilm).

2.4.2. ITS-1 nPCR

This method was adapted from Schönian et al. (2003). Primers addressed to internal transcribed spacer 1 (ITS-1) between the genes coding for SSU rRNA and 5.8S rRNA were used. For the first amplification 10.0 µL of DNA solution was added to 40.0 µL of PCR mix containing 15 pMol of the primers 5'-CTGGATCATTTCGGATG-3' and 5'-TGATACCACCTTATCGCACTT-3' and 0.2 mM deoxynucleoside triphosphates, 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 75 mM Tris-HCl pH 9.0, 2.0 mM (NH₄)₂SO₄, and 1.4 U of Taq DNA polymerase (Ludwig Biotec). The cycling conditions were 94 °C for 5 min followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s, 53 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s, followed by a final extension at 72 °C for 5 min. Amplification products were visualized on 2% agarose gel stained with ethidium bromide. The PCR product size stays between 300 and 350 bp. For the second amplification 10.0 µL of a 1:40 dilution of the first PCR product was added to 15 µL of PCR mix under the same conditions as the first amplification but with the following primers (15 pMol each): 5'-CATTTCGGATGATTACACC-3' and 5'-CGTTCTCAACGAAATAGG-3'. Positive samples yielded a PCR product between 280 and 330 bp.

For the restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis the non-purified PCR products (17 µL) were digested with 1 U of Hae III enzyme, for 4 h, at 37 °C. The restriction fragments were visualized on 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

2.5. Statistical analysis

The results were analyzed using the Pearson chi square test. The difference between the results was considered significant when $p < 0.05$.

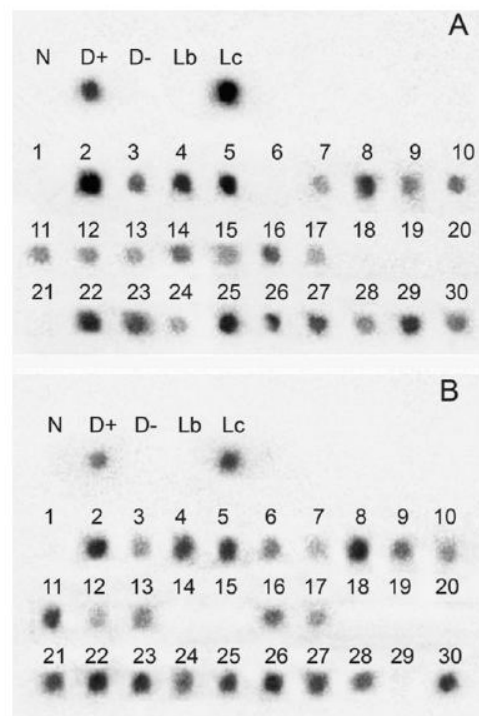


Fig. 1. CS samples Autoradiogram. The PCR products were hybridized with *L. (L.) chagasi* cloned kDNA minicircle probes labeled with ³²P for the right conjunctiva (A) and the left conjunctiva samples (B). Negative control (N); positive control dog (D+); negative control dog (D-); *L. (V.) braziliensis* control (Lb) (strain MHOM/BR/1975/M2903); *L. (L.) chagasi* control (Lc) (strain MHOM/1973/BH46); dogs samples (1–30).

3. Results

The non-invasive conjunctival swab (CS) was compared with blood (B) and skin biopsies (SB), two other less invasive samples potentially useful for massive screening of dogs by PCR. The samples were analyzed by two PCR methods: kDNA PCR-hybridization and ITS-1 nPCR.

Using CS samples the kDNA PCR-hybridization was able to detect parasite DNA in 24/30 dogs (80%) using the right conjunctiva (RC) and 23/30 dogs (76.6%) with the left conjunctiva (LC), 17/30 dogs (56.7%) by means of SB and 4/30 dogs (13.3%) with B. The CS positivities for RC and LC were significantly higher ($p < 0.05$) than the positivities obtained for SB and B. The SB showed a significantly higher positivity ($p < 0.05$) than found by the B samples. The CS positivity obtained combining the results of RC and LC was of 90% (27/30 dogs). The CS samples autoradiogram was showed in Fig. 1.

The assay of CS samples by ITS-1 nPCR revealed that 25/30 dogs (83.3%) were positive when using RC and 20/30 dogs (66.6%) were positive when using LC. Via the same

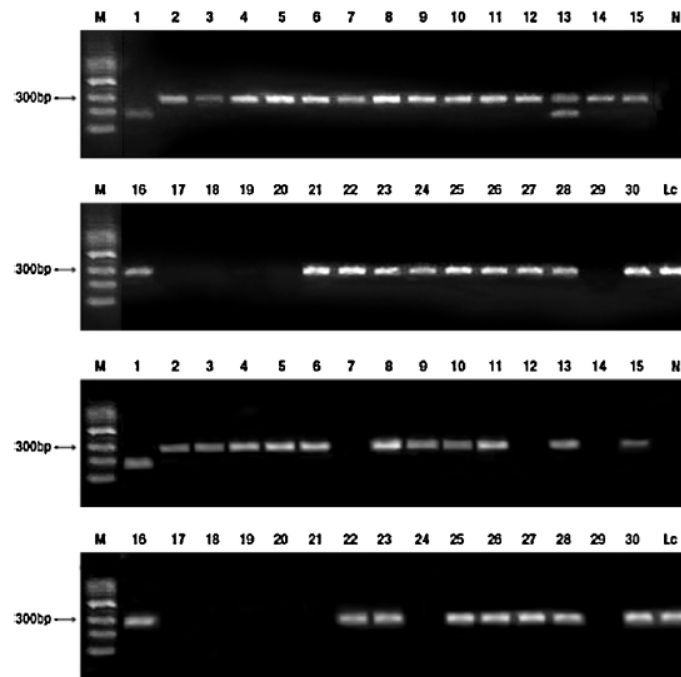


Fig. 2. ITS-1 nPCR analysis of CS samples. Electrophoresis of the ITS-1 nPCR products for the right conjunctiva (A) and the left conjunctiva samples (B). Molecular weight standard (M); negative control (N); *L. (L.) chagasi* control (Lc) (strain MHOM/1973/BH46); dogs samples (1–30).

method 15/30 dogs (50.0%) were positive by SB and 17/30 dogs (56.7%) with B. The CS positivity combining RC and LC was of 83.3%. The CS positivity for RC was significantly higher ($p < 0.05$) than obtained for SB and B samples. However, the CS positivity for LC did not show statistical difference in relation to SB and B ($p > 0.05$). For the ITS-1 nPCR no statistical difference was verified between the positivity of SB and B samples ($p > 0.05$). The ITS-1 nPCR uses two successive rounds of amplifications (nested) using two different groups of primers addressed to internal transcribed spacer 1 region of the ribosomal rRNA genes. The CS samples electrophoresis by this method were showed in Fig. 2.

The kDNA PCR-hybridization and ITS-1 nPCR methods showed similar sensitivities for CS (RC and LC) and SB samples. Moreover, for blood samples the positivity of ITS-1 nPCR (56.7%) was significantly higher than the positivity obtained by the kDNA PCR-hybridization (13.3%).

The RFLP analysis of the ITS 1 nPCR positive samples (Fig. 3) showed that the dog 01 was infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. In agreement with this result the sample 01 was positive in the PCR step of the kDNA PCR-hybridization method, but negative in the hybridization step with *L. (L.) chagasi* kDNA minicircle probe (Fig. 1). The RFLP profile of sample 13 suggests a case of co infection. All other animals were infected with *L. (L.) chagasi*

(= *L. (L.) infantum*). The six serum negative control dogs were proven negative in the PCR analysis for all samples tested. They were also negative for the parasitological test.

4. Discussion

In the present study only non-invasive (CS) or low-invasive (SB and B) samples were compared since our main objective was to choose a screening method useful for large-scale epidemiological surveys. Invasive procedures are not adequate for this purpose due the difficulty to obtain these samples outside of a veterinary centre and the dog owners' opposition.

Some works have obtained satisfactory results for canine VL diagnosis using B samples (Reale et al., 1999; Hu et al., 2000; Ikonomopoulos et al., 2003; Maia et al., 2009), while others point that blood samples frequently presenting problems related to DNA preparation and PCR inhibitors (Reale et al., 1999; Silva et al., 2001; Lachaud et al., 2002b; Nunes et al., 2007). Another disadvantage of using blood samples is that the parasite load in blood tends to lower in the course of infection. Good sensitivities using skin biopsies have also been reported in some studies (Manna et al., 2004; Quaresma et al., 2009). This tissue may be a good reference for PCR diagnosis since sandflies are infected by

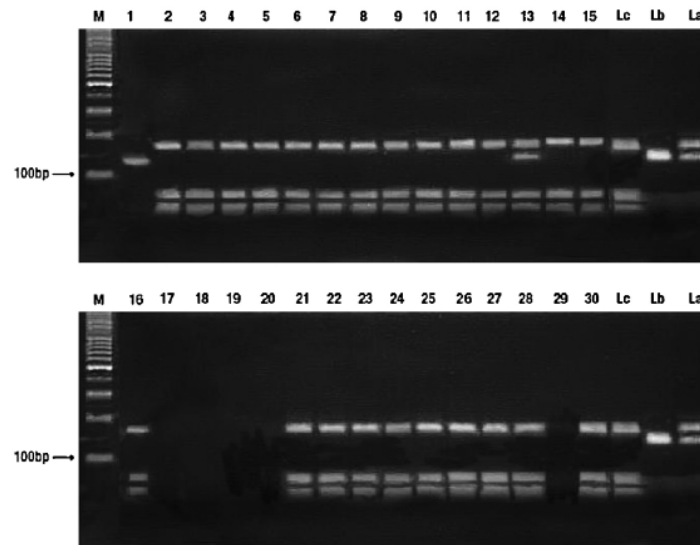


Fig. 3. Restriction fragment length polymorphism analysis of ITS-1 nPCR amplicons. Molecular weight standard (M); *L. (L.) chagasi* control (Lc) (strain MHOM/1973/BH46); *L. (V.) braziliensis* (Lb) (strain MHOM/BR/1975/M2903); *L. (L.) amazonensis* control (La) (strain IFLA/BR/67/PH8); dogs samples (1–30). The RFLP fragments were of 136 and 123 bp for *L. (V.) braziliensis*, 166 and 122 bp for *L. (L.) amazonensis* and 164, 72 and 35 bp for *L. (L.) chagasi*. The sample 1 was identified as *L. (V.) braziliensis*. All the other dogs were infected with *L. (L.) chagasi*. The RFLP profile of sample 13 suggested co infection. Samples 17–20 and 29 were negative for ITS-1 nPCR.

biting the dog skin. However, the drawback of skin biopsies is that it is relatively painful and bloody.

The PCR diagnosis with DNA from CS by the kDNA PCR-hybridization method exhibited a significantly higher sensitivity when compared to the one obtained with SB and B samples. Using ITS-1 nPCR statistical difference in relation to SB and B was verified only for RC. The use of combined results of both conjunctivas is recommended for the best performance of the CS procedure. The sensitivities of 90% (for PCR-hybridization) and 83.3% (for ITS-1 nPCR) obtained in this study using CS samples of both conjunctiva, were similar to the ones observed in other studies, also combining the conjunctivas, for VL diagnosis in symptomatic dogs. Strauss-Ayali et al. (2004) observed 92% of positivity using CS. Ferreira et al. (2008) detected parasite DNA in 91.7% of the dogs using CS. Pilatti et al. (2009) obtained between 73.9% and 95.6% of positivity by CS, depending of the PCR method used. Our results point out that the CS is equally effective for asymptomatic dogs.

The high CS sensitivity in asymptomatic dogs highlights this method as promising tool in mass-screening surveys by PCR, mainly because of the high prevalence of asymptomatic dogs in endemic areas and the lower sensitivity of tests based on antibody detection in asymptomatic infections (Leonides et al., 2002). In addition, CS is non-invasive, painless, fast, easily repeatable and acceptable by the dog owners.

Two PCR methods were used in this work: PCR-hybridization and ITS-1 nPCR. In a previous study Pilatti et al. (2009) demonstrated that the PCR-hybridization was

significantly more sensitive than ITS-1 nPCR. To compensate the lower sensitivity of ITS-1 nPCR, the DNA sample volume used for this method was increased in the present study. For ITS-1 nPCR were used 10.0 μ L of DNA sample and for PCR-hybridization 1.0 μ L was used. These conditions did not show statistical difference in the sensitivity of both methods for CS and SB samples. Surprising, for B samples the sensitivity of ITS-1 nPCR was significantly higher (56.7%) than verified for PCR-hybridization (13.3%), demonstrating that sensitivities of PCR methods can vary according to the biological sample.

This was the first report of CS for VL diagnosis by PCR in asymptomatic dogs. CS is very sensitive method and superior, in sensitivity and practicability, to other low-invasive samples. We concluded that the use of CS for the regular screenings of dogs by PCR must be considered.

Acknowledgements

This research was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (CBB-APQ-00399-08) and Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/Comissão Nacional de Energia Nuclear (CDTN/CNEN). We gratefully thank the Municipal Zoonotic Diseases Control Department of Belo Horizonte.

References

- Andrade, A.S.R., Gomes, R.F., Fernandes, O., Melo, M.N., 2001. Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop.* 78, 261–267.

Author's personal copy

206

R.S. Leite et al. / Veterinary Parasitology 170 (2010) 201–206

- Barbosa de Deus, R., Mares-Guia, M.L., Nunes, A.Z., Costa, K.M., Junqueira, R.G., Mayrink, W., Genaro, O., Tavares, C.A.P., 2002. *Leishmania major* like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 9, 1356–1361.
- Dantas-Torres, F., Felino de Brito, E.M., Brandão-Filho, P.S., 2006. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet. Parasitol.* 140, 54–60.
- Degrave, W., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopes, U., 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*—a mini-review. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* 89, 463–469.
- Deplases, P., Smith, N.C., Arnold, P., Lutz, H., Eckert, J., 1995. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 17, 451–458.
- Ferreira, S.A., Ituassu, L.T., Melo, M.N., Andrade, A.S.R., 2008. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 152, 257–263.
- Hu, X.S., Yang, W.T., Lu, H.G., Yan, H.P., Cheng, J.P., Ma, Y., Jin, B.Q., Zhang, T., 2000. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. *J. Parasitol.* 86, 822–826.
- Ikononopoulos, J., Kokotas, S., Gazouli, M., Zavras, A., Stoitsiou, M., Gorgoulis, V.G., 2003. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet. Parasitol.* 113, 99–113.
- Lachaud, L., Marchegui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P., Bastien, P., 2002b. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 210–215.
- Laison, R., Shaw, J.J., 1987. Ecology and epidemiology: New World. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R. (Eds.), *The leishmaniasis in biology and medicine*, vol. 1. *Biology and Epidemiology*. Academic Press Inc, London, pp. 291–363.
- Leontides, L.S., Saridomichelakis, M.N., Billinis, C., Kontos, V., Koutinas, A.F., Galatos, A.D., Mylonakis, M., 2002. A cross-sectional study of *Leishmania sp.* infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet. Parasitol.* 109, 19–27.
- Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J., Gonsalves, L., Campino, L., 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet. J.* 179, 142–144.
- Maia, C., Campino, L., 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.* 158, 274–287.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L.M., Morte, R.D., Cringoli, G., Staiano, N., Gravino, A.E., 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 125, 251–262.
- Michalsky, E.M., Rocha, M.F., da Rocha Lima, França-Silva, J.C., Pires, M.Q., Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., dos Santos, S.L., Barata, R.A., Romanha, A.J., Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S., 2007. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet. Parasitol.* 147, 67–76.
- Nunes, C.M., Dias, A.K., Gottardi, F.P., de Paula, H.B., de Azevedo, M.A., de Lima, V.M., Garcia, J.F., 2007. Polymerase chain reaction evaluation for canine visceral leishmaniasis diagnosis in dog blood samples. *Rev. Bras. Parasitol.* 16, 5–9.
- Pilatti, M.M., Ferreira, A.F., Melo, M.N., Andrade, A.S.R., 2009. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. *Res. Vet. Sci.* 87, 255–257.
- Quaresma, F.P., Murta, S.M.F., Ferreira, E.C., da Rocha-Lima, A.C.V.M., Xavier, A.A.P., Gontijo, C.M.F., 2009. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real time. *Acta Trop.* 111, 289–294.
- Reale, S., Maxia, L., Vitale, F., Glorioso, N.S., Caracappa, S., Vesco, G., 1999. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2931–2935.
- Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H.D.F.H., Presber, W., Jaffe, C.L., 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 47, 349–358.
- Silva, E.S., Gontijo, C.M., Pirmez, C., Fernandes, O., Brazil, R.P., 2001. Short report: detection of leishmania DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 896–898.
- Silva, E.S., van der Meide, W.F., Schoone, G.J., Gontijo, C.M.F., Schalling, H.D.F.H., Brazil, R.P., 2006. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet. Res. Commun.* 30, 637–643.
- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gomen, L., Baneth, G., 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J. Infect. Dis.* 189, 1779–1833.
- Tesh, R., 1995. Control of zoonotic visceral leishmaniasis is it time to change strategies? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52, 287–292.

ARTIGO 2

OPEN ACCESS Freely available online



Canine Skin and Conjunctival Swab Samples for the Detection and Quantification of *Leishmania infantum* DNA in an Endemic Urban Area in Brazil

Sidney de Almeida Ferreira¹, Rodrigo Souza Leite², Leonardo Trindade Ituassu¹, Gregório Guilherme Almeida¹, Daniel Menezes Souza¹, Ricardo Toshio Fujiwara¹, Antero Silva Ribeiro de Andrade², Maria Norma Melo^{1*}

¹ Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, ² Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Comissão Nacional de Energia Nuclear, Campus da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

Abstract

Background: We evaluated kDNA PCR/hybridization and quantitative real-time PCR (qPCR) targeting the gene of DNA polymerase of *Leishmania infantum* for CVL diagnosis and assessment of parasite load in clinical samples obtained invasively and non-invasively.

Methodology/Principal Findings: Eighty naturally infected dogs from an endemic urban area in Brazil were used. Animals were divided into two groups based on the presence or absence of CVL clinical signs. Skin biopsies, bone marrow, blood and conjunctival swabs samples were collected and submitted to *L. infantum* DNA detection. In addition, anti-*Leishmania* antibody titers were measured by Immunofluorescence antibody test. The symptomatic dogs had increased titers compared to asymptomatic dogs ($P = 0.025$). The frequencies of positive results obtained by kDNA PCR/hybridization for asymptomatic and symptomatic dogs, respectively, were as follows: right conjunctiva, 77.5% and 95.0%; left conjunctiva, 75.0% and 87.5%; skin, 45.0% and 75.0%; bone marrow, 50.0% and 77.5%; and blood, 27.5% and 22.5%. In both groups, the parasite load in the skin samples was the highest ($P < 0.0001$). The parasite loads in the conjunctival swab and bone marrow samples were statistically equivalent within each group. The parasite burden in conjunctival swabs was higher in the dogs with clinical signs than in asymptomatic dogs ($P = 0.028$). This same relationship was also observed in the bone marrow samples ($P = 0.002$). No differences in amastigotes load in the skin were detected between the groups.

Conclusions: The conjunctival swab is a suitable clinical sample for qualitative molecular diagnosis of CVL. The highest parasite burdens were detected in skin regardless of the presence of VL-associated clinical signs. The qPCR results emphasized the role of dogs, particularly asymptomatic dogs, as reservoirs for CVL because of the high cutaneous parasite loads. These results may help to explain the maintenance of high transmission rates and numbers of CVL cases in endemic urban regions.

Citation: de Almeida Ferreira S, Leite RS, Ituassu LT, Almeida GG, Souza DM, et al. (2012) Canine Skin and Conjunctival Swab Samples for the Detection and Quantification of *Leishmania infantum* DNA in an Endemic Urban Area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 6(4): e1596. doi:10.1371/journal.pntd.001596

Editor: Elodie Ghedin, University of Pittsburgh, United States of America

Received: October 14, 2011; **Accepted:** February 22, 2012; **Published:** April 10, 2012

Copyright: © 2012 de Almeida Ferreira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Funding was provided by "Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico" (CNPq), www.cnpq.br/; "Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais" (FAPEMIG), www.fapemig.br/; and "Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais" (PRPq), www.ufmg.br/prpq/. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: melo@icb.ufmg.br

Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a severe zoonotic disease in Latin America that is caused by the protozoan *Leishmania infantum* [= *L. chagasi*]. The parasite is transmitted through the bite of infected female phlebotomine sand flies. The prevalence of VL has been expanding throughout the world [1], and Brazil is one of six countries that account for 90% of all recorded human VL cases worldwide [2]. VL is the most severe clinical manifestation of *Leishmania* infection and it has high lethality in cases without suitable treatment [3].

In the context of VL prophylaxis, the rapid and accurate diagnosis of infected dogs is critical for the control of this zoonotic disease because they represent the main domestic reservoir [4]. Dogs have a close relationship with humans in both rural and

urban areas, and canine cases usually precede human cases [4,5]. Therefore, although VL remains more prevalent among dogs than humans, the presence of infected dogs may increase the risk for human infection in some situations [6].

The precise diagnosis of canine VL (CVL) is complex. The different available diagnostic techniques include parasitological demonstration, immunological tests and the detection of parasite DNA.

The VL control strategy based on the euthanasia of seropositive dogs in Brazil has been criticized predominately because the disease burden has not diminished over time [7,8]. Although substantial technological improvements have been made, there is no gold standard technique or absolutely precise method for CVL diagnosis [9]. In most cases, a final diagnosis of CVL is obtained using a combination of distinct tests.

Author Summary

Visceral leishmaniasis (VL) is considered the most lethal manifestation among the diseases caused by genus *Leishmania*. The main control measures for VL are: diagnosis and early treatment of human cases, insecticide vector control, and euthanasia of seropositive dogs. Although these strategies have been continuously applied in Brazil, the number of VL cases has increased and this disease still poses as a serious public health problem. Belo Horizonte is an endemic urban area in Brazil and it is considered by the Ministry of Health the third most affected Brazilian metropolitan region by VL. In the context of prophylaxis, the correct diagnosis of infected dogs is critical for the VL control because dogs represent the main domestic reservoir. However, the serological diagnosis techniques used in large-scale for canine screening in Brazil have important limitations including the difficulty of diagnosing asymptomatic dogs. Molecular methods based on Polymerase Chain Reaction (PCR) and real-time PCR (qPCR) have greatly improved VL diagnosis. Based on this, we aimed to evaluate different canine clinical samples for qualitative VL diagnosis by PCR and quantification of parasite load by qPCR in dogs from Belo Horizonte. The possible implications of results are discussed with emphasis on skin and conjunctival swab samples.

In Brazil, serological techniques based on the detection of anti-*Leishmania* antibodies, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescence antibody test (IFAT) are used for the large-scale screening of canine populations [10]. However, these methods have limitations related to their sensitivity and specificity that may lead to inconsistent results [11].

The detection of *Leishmania* DNA based on polymerase chain reaction (PCR) represents an alternative for VL diagnosis with highly sensitive, specific and versatile methods [12]. With these techniques, several types of canine clinical samples including bone marrow aspirates, spleen, lymph node, urine, blood, conjunctival swabs and skin biopsies can be used for VL diagnosis [13,14,15,16]. PCR has been suggested as a useful method to detect subclinical infections and as a possible addition to serological tests to definitively diagnose inconclusive cases that exhibit low antibody titers or cross-reactivity [17]. In recent years, quantitative real-time PCR (qPCR) has demonstrated high sensitivity in detecting low parasitic loads [18]. Furthermore, qPCR is a reliable technique to diagnose CVL and monitor tissue parasite load in treated dogs in countries where the treatment is permitted [19,20].

The present work was designed to evaluate canine clinical samples that were obtained invasively and non-invasively in two contexts. First, this study determined their usefulness for CVL molecular diagnosis by conventional PCR in naturally infected dogs with and without clinical signs compatible with this disease. Additionally, parasite burdens were assessed using qPCR. This work was conducted in Belo Horizonte, the capital of Minas Gerais, Brazil, where the CVL prevalence was estimated around 7.63% in more than 300,000 screened dogs [21,22]. VL is urbanized in this city, which the Ministry of Health considers one of Brazilian metropolitan region most affected by this disease [8,23].

Materials and Methods**1. Ethics Statement**

Experiments with dogs were performed in compliance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Committee on Ethics of Animal Experimentation ("Comitê de Ética em

Experimentação Animal" – CETEA, national guidelines, Law number 11.794, 8/10/2008) from Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); protocol number 183/08 was approved on 04/03/2009.

2. Dogs

Eighty naturally infected mongrel dogs of both sexes and unknown ages destined to be euthanized were obtained from the Municipal Zoonotic Diseases Control Department of Belo Horizonte during routine surveillance. All animals had positive ELISA and IFAT and/or conventional parasitological test results. The dogs were submitted to a thorough physical exam and an aliquot of serum from each dog was obtained for biochemical evaluations. Serum proteins levels were assessed by the Biuret reagent; albumin and globulin concentrations were also estimated (BIOCLIN, Brazil). Serum urea was measured using a colorimetric enzymatic method (BIOCLIN, Brazil). In this case, sample absorbances at 510 nm were obtained using a spectrophotometer (Epoch, Biotek, USA). Serum creatinine was assessed using the colorimetric kinetics method (Cobas Mira Classic, Roche, Germany).

Based on the physical examination and the serum sample results, dogs were divided in two groups. Group 1 was composed of dogs without any suggestive clinical manifestations of CVL (n = 40). Group 2 was composed of dogs that presented clinical signs associated with VL, such as lymphadenopathy, alopecia, severe weight loss, onychogryphosis, keratoconjunctivitis, skin lesions, a low albumin/globulin ratio and/or high levels of creatinine and urea (n = 40). Ten healthy dogs that tested negative for CVL and were destined for adoption comprised the negative control group. This last group was kept in the kennel of Biological Sciences Institute of UFMG under controlled, isolated conditions with proper nutritional supply. Serum samples from all dogs examined in this study were resubmitted to ELISA and IFAT tests that were performed in the Serology Laboratory of the Parasitology Department of UFMG.

3. Clinical samples

Prior to sample collection, the dogs were anesthetized with 2% Xilazine (2.2 mg/kg, Syntec, Brazil) and 2.5% Thiopental (9.0 mg/kg, Cristália, Brazil). For DNA extraction, 1 mL of peripheral blood was collected from each dog in tubes containing Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). The same volume of blood was collected in tubes without EDTA and centrifuged at 415 g; serum was collected for serodiagnosis and biochemical evaluation. Skin biopsies were obtained from the internal surface of the left ear using 5.0-mm sterile punches. Bone marrow aspirates were collected from the sternum using sterile needles. The injection site was previously cleaned with polyvinylpyrrolidone-iodine (Vansil, Brazil). Each aspirate was divided into two fractions. The first fraction (200 µL) was transferred to sterile tubes for DNA purification and the second was used for the parasitological test. All samples were kept on ice during transportation and stored at -20°C until use. Conjunctival swabs were obtained separately from both lower conjunctivas using sterile cotton swabs manufactured for bacteriological isolation. The swab tips were broken off, transferred to DNase-free tubes and stored at -20°C until use.

4. Parasitological test

The presence of parasites was investigated using a fraction of the bone marrow aspirates added to Novy-McNeal-Nicolle medium (NNN) with 12% rabbit's defibrinated blood overlaid with α -Minimum Essential Medium (GIBCO BRL, USA) containing

10% fetal calf serum (CULTILAB, Brazil), streptomycin (1.0 µL/mL) and penicillin (100 U/mL) (GIBCO BRL, Life Technologies, USA). The cultures were examined by optical microscopy and were subcultured three times over a 10-day period, after which all of the culture tubes were examined again. In addition, slide smears were prepared from skin biopsies and bone marrow samples. The slides were stained using the modified Giemsa method (Bioclin, Brazil) according to the manufacturer's protocol and subsequently observed under an optical microscope at 1000× magnification. These slides were analyzed when cultures were negative or exhibited signs of contamination.

5. Enzyme linked immunosorbent assay

Total serum IgG was measured using a previously described technique [24] with minor modifications. Briefly, the antigen used for the ELISA was a total soluble antigenic preparation from cultured promastigotes from *L. infantum*, strain MHOM/BR/1967/BH46 that were disrupted by ultrasound (40 Hz) on ice and centrifuged at 150 g for 10 min. Individual wells of 96-well microplates were coated with the soluble antigen at a final concentration of 2 µg/mL in 0.05 M carbonate buffer (pH 9.6). A volume of 100 µL per well was used. Blocking was performed using PBS with 0.2% Tween-20 and 2% casein (Sigma, USA). To detect IgG, 100 µL of individual canine serum samples was serially diluted and transferred into each well. After proper treatment, 100 µL of peroxidase-conjugated rabbit anti-dog IgG (Sigma, USA) (diluted 1:2000) was added to each well. Each well then received 100 µL of a mixture containing a 40% solution (w/v) of ortho-phenylenediamine in phosphate/citrate buffer (pH 5.0) and 30 volumes of H₂O₂. Absorbance values at 492 nm were measured in an automatic ELISA reader (Bio-Rad Model 550, USA). The cut-off values established for each reaction were the mean absorbance values +2 standard deviations from Brazilian dogs obtained from nonendemic areas for *L. infantum* [10].

6. Immunofluorescence antibody test

IFAT was performed according to an established method [25] using promastigotes from the *L. infantum*, strain described above. This strain is routinely used in Parasitology Department of UFMG for the detection of anti-*Leishmania* antibodies. The parasite cells used in this test were grown to stationary phase in liver infusion tryptose (LIT) medium [26] and the samples were considered positive when fluorescence was observed at dilutions ≥1:40.

7. DNA Extraction

DNA was extracted from the blood and bone marrow samples using the GE Healthcare Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin kit. Peripheral blood (1 mL) was added to 3.0 mL of red blood cell lysis solution [(10 mM KHCO₃, 155 mM NH₄Cl, and 0.1 mM EDTA (pH 8.0)]. The protocol was then performed following the manufacturer's recommendations. A total of 200 µL of bone marrow aspirate was processed in the same manner as the blood samples. However, treatment with the red blood cell lysis solution was omitted. The final volume of each DNA solution was 100 µL. Samples were then stored at 4°C until use.

DNA from the skin biopsies was purified using the Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega USA) following the manufacturer's protocol. The final volume of each DNA solution was 160 µL and the samples were stored at 4°C until use.

DNA from each conjunctival swab was extracted separately using the phenol-chloroform purification method. A mixture of lysis buffer solution [50 mM Tris, 50 mM NaCl, and 10 mM EDTA (pH 8.0)], 1% Triton X-100 and proteinase K (250 µg/mL) was added to each cotton swab. The mixture was incubated

for 2 h at 56°C, eluted from the cotton swab, transferred to a PLG-H phase-lock gel tube (Eppendorf, Germany) and then mixed with 500 µL of 75% Tris-saturated phenol (Sigma) with 25% chloroform-isoamyl alcohol. The aqueous phase was separated from the organic phase by centrifugation at 12,000 g at 4°C for 5 min, and the supernatant was transferred to a new PLG-H phase-lock gel tube. DNA extraction was repeated twice, first with 500 µL of a 50% phenol and 50% chloroform-isoamyl alcohol solution and then with 100% chloroform-isoamyl alcohol. DNA was precipitated in one volume of isopropanol-sodium acetate followed by a 75% ethanol wash. The resulting DNA pellet was suspended in 30 µL of autoclaved ddH₂O.

8. Conventional PCR

Conventional PCR was performed using primers specific to the *Leishmania* sp. kinetoplast DNA (kDNA) minicircle conserved region, as described elsewhere [27]. Here, 200 ng of each of the following primers were used: 5'-(G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACAACCCC-3' and 5'-GGGGAGGGGC-GTTCTGCGAA-3' (GIBCO, São Paulo-Brazil). DNA samples at a final concentration of 1.0 ng/µL from *L. infantum* (MHOM/BR/1973/BH46 strain) and *L. braziliensis* (MHOM/1975/BR/M2903 strain) served as positive controls. DNA extracted from a dog with a confirmed infection was also used as a positive control. DNA from a healthy dog known to be negative for leishmaniasis served as a negative control. Furthermore, mixtures without DNA were included in all tests. From each naturally infected dog, 1.0 µL of DNA preparation from each clinical sample was submitted to the PCR. PCR amplifications were performed using a PTC-100 thermocycler (MJ Research, USA). All amplification products were analyzed on 2% agarose gels stained with ethidium bromide. The expected size of the amplified target was 120 base pairs (bp).

9. Hybridization

After the PCR assay, 10 µL of each amplification product was applied to a nylon membrane using a Bio Dot apparatus (Hybridot Manifold, BRL). Each well received 110 µL of 0.4 M NaOH and 25 mM EDTA (pH 8.0) denaturation solution; the membranes were then rinsed with 2× SSC (0.3 M NaCl and 0.3 mM sodium citrate) and dried. The DNA was fixed to the surface by UV crosslinking (0.12 J/cm²).

Cloned kDNA minicircles from *L. infantum* were labeled with ³²P[α]dCTP using the random primer method (Invitrogen, USA). Hybridization conditions were reproduced as explained elsewhere [28]. Hybridization was also performed using cloned kDNA minicircle probes from *L. braziliensis* according to the same experimental design explained for *L. chagasi* probes.

10. Real-time PCR

The parasite loads were calculated by real-time PCR according to a method described elsewhere [29,30] with minor modifications. Conjunctival swab, bone marrow and skin samples (240 DNA preparations) were evaluated. The parasite burdens were estimated using the following primers: Forward, 5' TGT GCG TTG CAG ACC AGA TG 3' and Reverse, 5' GCA TCG CAG GTG TGA GCA C 3'. These primers amplified a 90 bp fragment of a single-copy-number *L. infantum* DNA polymerase gene (GenBank accession number AF009147). Canine housekeeping β-actin gene was used as endogenous control in order to normalize initial DNA concentrations and to verify sample integrity. The primers used to amplify a 307-bp fragment of β-actin were as follows: Forward, 5' CTTCCTACAACGAGCTGCGC 3' and Reverse, 5' TCATGAGGTAGTCGGTCAGG. PCR was carried out in a final volume of 10 µL containing 0.7 pmol of each β-actin

primer or 0.8 pmol of DNA polymerase primers, 2× SYBR GREEN reaction master mix (Applied Biosystems, USA), 4.0 µl of DNA with a final concentration of approximately 20 ng/µL and an enough volume of ultrapure water. Reactions were processed and analyzed in an ABI Prism 7500 Sequence Detection System (SDS Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The followed steps were programmed: an initial denaturation at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 1 min. Standard curves were prepared using known amounts of TOPO PCR 2.1 plasmids (Invitrogen, USA) that contained canine genes of β-Actin or *L. infantum* DNA polymerase gene. The respective cycle threshold (C_T) values obtained for samples were calculated based on the corresponding standard curve; the results were defined as the number of parasites per canine cells. Overall, 20% of samples were chosen randomly and resubmitted to PCR to verify technique reproducibility.

11. Statistical analysis

The frequencies of positive results obtained from all the clinical samples were compared separately within each group using the Pearson χ^2 test with a 5% significance level. This same statistical tool was used to compare the results between groups.

Kappa index was used to assess the reproducibility of molecular tests. Sensitivity and specificity for PCR-hybridization performed with different clinical samples were calculated using 2×2 tables and the conventional parasitological test was adopted as a reference test. For the data with non-parametric distribution, the Mann-Whitney test was used for comparisons between two data sets. The Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test was performed for the comparison of three samples simultaneously. In cases where data were distributed parametrically, Student's *t* test or one way ANOVA was used to compare two or three data sets respectively. The difference between the results was considered statistically significant at a *P* value < 0.05. All calculations were performed using the Winpepi (PEPI for Windows) and GraphPad Prism 5.0 software programs.

Results

First, the healthy dogs, which did not show any clinical signs of CVL, were submitted to the parasitological, serological and molecular tests described above. All of these procedures showed negative results for the control group. Additionally, all of the positive hybridization results obtained from the naturally infected dogs examined in this study were identified as *L. infantum* (data not shown). All negative and positive controls of assays carried out in this work showed expected results and validated the obtained data.

1. Serology

Three animals that did not exhibit any clinical signs of CVL had negative ELISA results. Two of these dogs were also negative by IFAT. Only one dog with clinical signs had a negative IFAT result. These animals had positive parasitological test results, confirming the presence of infection. All other dogs tested positive for CVL by both serological assays. The absorbance values obtained by ELISA were not statistically different between the groups ($P > 0.05$) (data not shown). In the IFAT assays, the dilutions varied from 1:40 to 1:2,560 in the dogs from group 1 and from 1:160 to 1:10,240 in the dogs from group 2. Examination of the IFAT assay titers between groups revealed that the dogs with clinical signs of VL had higher titers than dogs without clinical signs ($P = 0.025$) (Figure 1).

2. Dogs without clinical signs: conventional PCR/hybridization and qPCR

The frequency at which conventional PCR/hybridization produced a positive result from the conjunctival swabs was calculated separately for the right and left conjunctiva in each group. Then, the positive detection rates in the different clinical samples were compared within each group. Approximately 20% of all DNA preparations were retested by conventional PCR and the same proportion of samples was retested using qPCR. The repetitions received different codes and were performed blinded. The agreement and kappa values were, respectively, as follows: PCR-hybridization, 93% and 0.85; real-time PCR, 100% and 1.0 (Table S1). The sensitivity and specificity measures are shown in table S2.

In group 1, the PCR/hybridization positive result rates for the clinical samples were as follows: right conjunctiva, 77.5% (31/40); left conjunctiva, 75.0% (30/40); skin, 45.0% (18/40); bone marrow, 50.0% (20/40); and blood, 27.5% (11/40) (Table 1). In this group, the positive results obtained from either the right or the left conjunctiva were statistically greater than those from any of the other clinical samples tested ($P < 0.05$) (Table 1).

In the qPCR assays, the efficiency of standard curves was 97% and 100% for DNA polymerase and β-actin respectively. In group 1, the parasite burdens in the conjunctival swab and bone marrow samples were statistically equivalent ($P > 0.05$). In contrast, the parasite load in the skin was higher than in the other clinical samples ($P < 0.0001$) (Figure 2A).

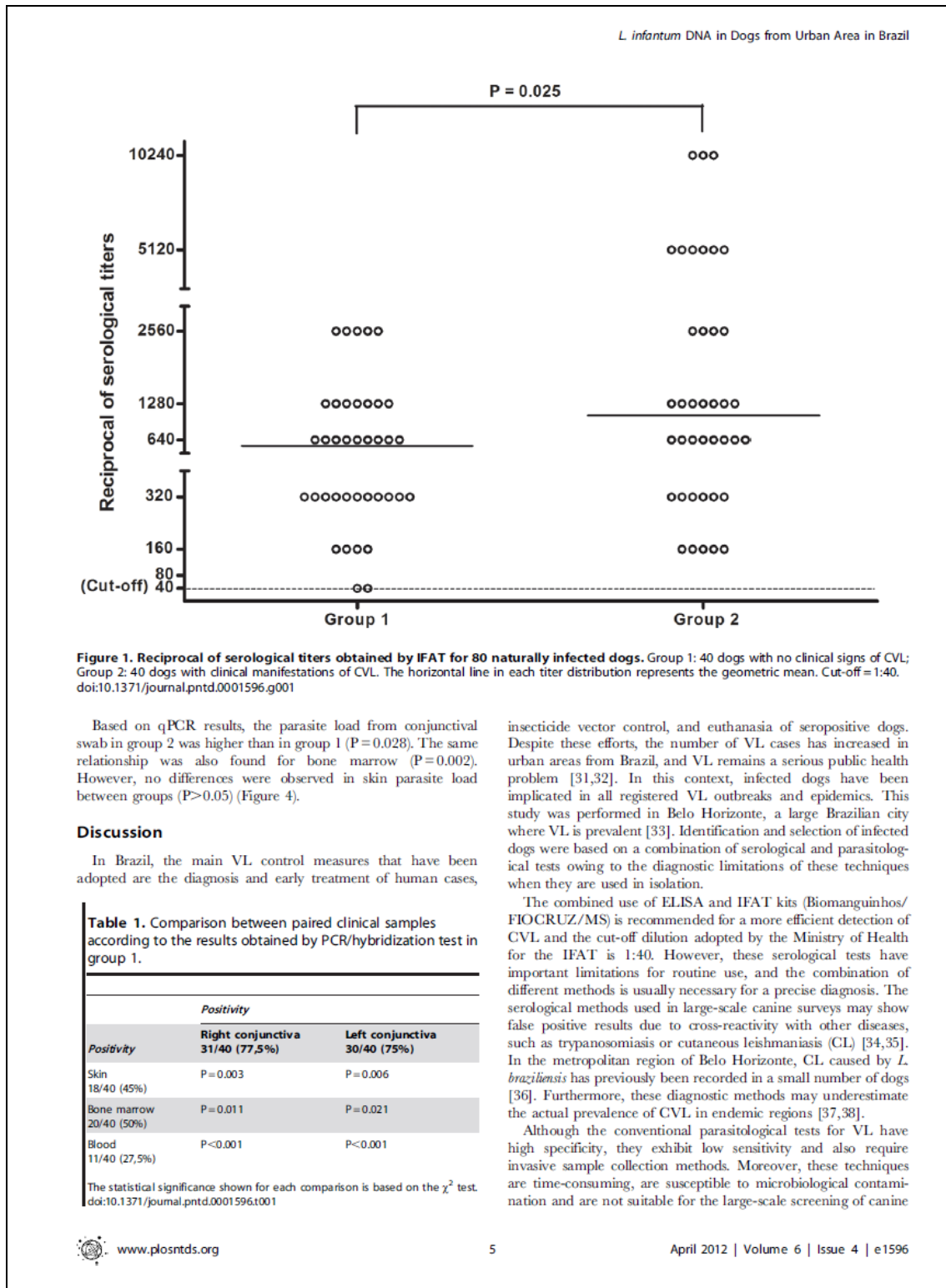
3. Dogs with clinical signs: conventional PCR/hybridization and qPCR

In group 2, the positive result rates for PCR/hybridization were as follows: right conjunctiva, 95.0% (38/40); left conjunctiva, 87.5% (35/40); skin, 75.0% (30/40); bone marrow, 77.5% (31/40); and blood, 22.5% (9/40) (Table 2). The percentage of positive results in right conjunctival swabs was statistically higher compared to the other samples tested ($P < 0.05$). On the other hand, there was no difference between the results obtained from the left conjunctiva and those from the skin or bone marrow ($P > 0.05$). However, there was a statistical difference between the left conjunctiva and blood ($P < 0.001$) (Table 2).

The parasite loads in the conjunctival swabs and bone marrow were not statistically different ($P > 0.05$). However, the parasite burden in the skin was statistically higher than those obtained from other clinical samples ($P < 0.0001$) (Figure 2B).

4. Comparison between groups – molecular techniques

There were no differences in the kDNA PCR/hybridization results when the right and left conjunctival samples were compared within and between groups ($P > 0.05$) (data not shown). Therefore, the dogs were counted as positive in one of the conjunctivas or both. The rates of positive results in dogs exhibiting no clinical signs and those with clinical status were 87.5% (35/40) and 95.0% (38/40), respectively. These results were not statistically different ($P > 0.05$) (Figure 3). The results from the other clinical samples were also compared between groups. The positive rates in the skin samples from dogs with clinical signs were statistically higher than from dogs without clinical signs ($P = 0.006$). Similarly, the positive rate in bone marrow samples was higher in the symptomatic group (group 2) compared to the group 1 ($P = 0.011$). In contrast, the positive results detected in the blood were not different between the two groups ($P > 0.05$) (Figure 3).



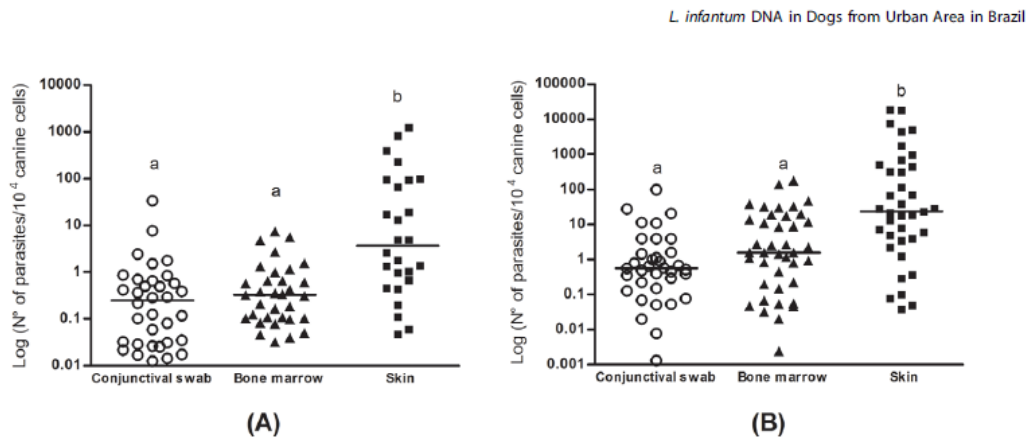


Figure 2. Parasite load in clinical samples of naturally infected dogs. (A): asymptomatic dogs; (B): dogs with clinical manifestations suggestive of VL. (a): No statistical difference among the measures indicated. (b) The parasite load in the skin was higher than those estimated in conjunctival swab and bone marrow samples ($P < 0.0001$). doi:10.1371/journal.pntd.0001596.g002

populations [11]. On the other hand, molecular-based diagnostic techniques have become an important resource to improve CVL diagnosis because of its high sensitivity and specificity.

The molecular analyses of this work were divided in two parts. First, qualitative conventional PCR followed by hybridization was used to identify the proportion of dogs that exhibited *Leishmania* DNA in different clinical samples. In this case, the frequency of positive results obtained from skin samples was higher in dogs with clinical manifestations compared to asymptomatic dogs. This same relationship was also observed for bone marrow samples. Different CVL studies have demonstrated high positive indices for conventional PCR test of skin samples from dogs with different clinical signs, and it has been suggested that this technique based on use of ear skin could be the best procedure for CVL diagnosis [39]. However, the collection of ear skin samples is painful, bloody and invasive and requires local anesthesia and aseptic manipulation.

Bone marrow is often included in research on VL diagnosis and represents an important source of *L. donovani* complex parasites for parasitological tests because of the lymphoid tropism of this group of protozoans. PCR performed using DNA from the bone marrow has shown good sensitivity for CVL diagnosis [14,16] indicating that this clinical sample is a suitable source of DNA for molecular

diagnosis. However, the collection of bone marrow aspirates is invasive and traumatic for the dog. Complete anesthesia of the animal is necessary, and this usually results in opposition by dog owners. These limitations make this procedure unsuitable for large-scale surveys. Moreover, in the present study, the rates of positive results obtained from the bone marrow and skin using the kDNA PCR/hybridization method were lower than those from conjunctival swab, which involve a non-invasive collection method.

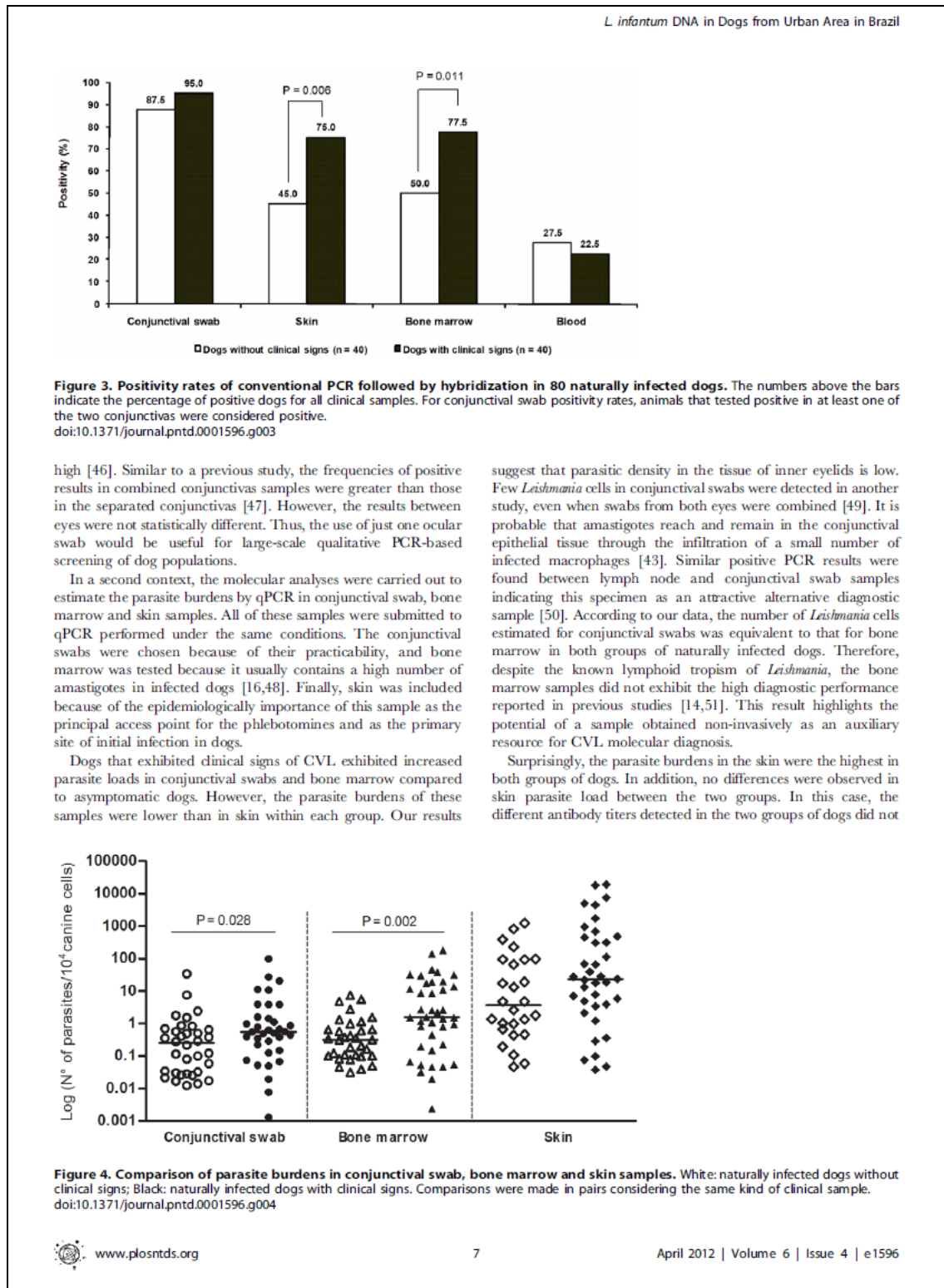
Although blood is a less invasive collection method, it had the lowest positive detection rate in both groups. The evaluation of blood for the diagnosis of CVL by PCR is still controversial. Different studies have reported that blood samples worked well for PCR-based CVL diagnosis [40,41]. In contrast, other authors encountered problems with the use of blood samples for diagnosis, such as the presence of PCR inhibitors, variations in parasite load, and low sensitivity [42,43]. At the present work, the smaller frequencies of positive results were obtained from blood. Almost all amplifications products from this clinical sample presented a lot of unspecific bands at agarose gel analysis. Probably, this decreased the specificity of the primers and might have reduced the sensitivity of hybridization. The occurrence of unspecific amplifications was particularly evident in this kind of sample and the real reasons of that and the dynamics of parasite load in canine blood remains unclear [42].

For qualitative molecular diagnosis, the conjunctival swab samples showed the best results with high percentages of positive results for both groups of dogs. In this experimental context, the frequency of positive results detected from the conjunctival swab samples did not appear to depend on the clinical status of the infected dogs. Although the IFAT has showed different results between dogs with and without clinical signs, the high positive detection rates obtained from conjunctival swab samples by kDNA PCR/hybridization were not dependent on anti-*Leishmania* antibody titers. In a longitudinal study on the detection of canine *Leishmania* infections by PCR, conjunctival swabs showed a slow positive conversion prior to seroconversion in areas with elevated CVL prevalence [44]. The ocular region can be reached by *Leishmania* through hematogenous dissemination [45] or by direct infection through phlebotomine bites around the dogs' eyes particularly in endemic regions where the vector density can be

Table 2. Comparison between paired clinical samples according to the results obtained by PCR/hybridization test in group 2.

	Positivity	
	Right conjunctiva	Left conjunctiva
Positivity	38/40 (95%)	35/40 (87.5%)
Skin 30/40 (75%)	P = 0.012	P > 0.05
Bone marrow 31/40 (77.5%)	P = 0.023	P > 0.05
Blood 9/40 (22.5%)	P < 0.001	P < 0.001

The statistical significance shown for each comparison is based on the χ^2 test. doi:10.1371/journal.pntd.0001596.t002



appear to be correlated with parasite burden in the skin. The serological response correlated positively with the clinical status of dogs, confirming results found in other studies [52]. Manna et al (2006) demonstrated that infected asymptomatic dogs had higher parasite load in the skin than in lymph node. Additionally, the cutaneous parasitism remained high for 6 months [53]. When compared to parasite load estimated for bone marrow samples based on the Leishman Donovan Units technique, an increased parasite burden in the skin was also found [52]. Our results corroborate these findings in an endemic urban region in Brazil and emphasize the role of infected dogs, especially the asymptomatic dogs, as a reservoir. These animals represent a risk for sand fly infection because of the intense parasitism of their skin. As a matter of fact, the serological tests performed for the large-scale screening of dogs in Brazilian cities can fail to detect subclinical infections [17]. Additionally, a delay between the discovery of seropositive dogs and culling is common [7]. These factors associated with considerable skin parasitism of dogs, especially those without clinical signs, may contribute to the continual high transmission rates and prevalence of CVL cases in Belo Horizonte and possibly in other endemic regions of Brazil and world.

The molecular techniques used in this study showed a good reproducibility with high degree of agreement. These results indicate that these tests are reliable for the purposes described in this work.

Taken together, our results indicate that conjunctival swabs are suitable for qualitative molecular CVL diagnosis and that their widespread use should be considered. Nonetheless, these samples exhibited low parasite load in infected dogs sampled in this study, similar to the bone marrow samples. In spite of this, it was possible to accurately quantify *Leishmania* cells in dogs studied. This clinical

sample associated with these molecular techniques could be useful for human VL diagnosis and must be investigated. The highest parasite burdens were detected in skin samples from both symptomatic and asymptomatic dogs. These results represent a great challenge for CVL control in VL endemic areas in Brazil, such as Belo Horizonte. This work can be seen as a basis for large-scale field studies to verify the epidemiological implications of the molecular techniques and canine clinical samples used here.

Supporting Information

Table S1 Reproducibility of molecular methods. (DOC)

Table S2 Sensitivity and specificity of PCR-hybridization performed with different clinical samples for canine visceral leishmaniasis diagnosis. (DOC)

Acknowledgments

The authors thank the "Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/Comissão Nacional de Energia Nuclear" (CDTN/CNEN) for partnership and the "Centro de Controle de Zoonoses" (CCZ) from Belo Horizonte for supplying the dogs.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SAF RTF ASRA MNM. Performed the experiments: SAF RSL LTI GGA DMS. Analyzed the data: SAF GGA DMS RTF MNM. Contributed reagents/materials/analysis tools: RTF ASRA MNM. Wrote the paper: SAF RTF ASRA MNM.

References

- Shaw J (2007) The leishmaniases - survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 541-547.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, et al. (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5: 873-882.
- Alvar J, Vactayo S, Bern C (2006) Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology* 22: 552-557.
- Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, et al. (1998) Studies on control of visceral leishmaniasis: Impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59: 55-57.
- Gavani ASM, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR (2002) Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *Lancet* 360: 374-379.
- Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, et al. (2007) Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiology and Infection* 135: 195-201.
- Courtenay O, Quinell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C (2002) Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *Journal of Infectious Diseases* 186: 1314-1320.
- Ministério da Saúde B (2007) Leishmaniose visceral - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan. Available: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>.
- Maia C, Campino I (2008) Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology* 158: 274-287.
- Costa-Val AP, Melo MN, Cavakanti RR, Gontijo NDF, Michalick MSM, et al. (2007) Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Leishmania (Leishmania) longipalpis* infectivity. *Veterinary Journal* 174: 636-643.
- Gomes YM, Cavalcanti MP, Lira RA, Alath FGC, Alves LC (2008) Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *Veterinary Journal* 175: 45-52.
- Gontijo CMF, Melo MN (2004) Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 7: 338-349.
- Ferreira SD, Inassa LT, Melo MN, Andrade ASR (2006) Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 152: 257-263.
- Solano-Gállego I, Koutinas A, Miro G, Cardoso I, Pennisi MG, et al. (2009) Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 165: 1-18.
- Leite RS, Ferreira SD, Inassa LT, Melo MN, Andrade ASR (2010) PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Veterinary Parasitology* 170: 201-206.
- Maia C, Ramada J, Cristovao JM, Goncalves L, Campino I (2009) Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *Veterinary Journal* 179: 142-144.
- Miro G, Cardoso I, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G (2008) Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology* 24: 371-377.
- Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gállego I, et al. (2006) Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 137: 214-221.
- Manna I, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, et al. (2008) Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Veterinary Journal* 177: 279-282.
- Pennisi MG, Reale S, Lo Giudice S, Masucci M, Caracappa S, et al. (2005) Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Veterinary Research Communications* 29: 301-303.
- Lopes EGP, Magalhães DF, Silva JA, Haddad JPA, E.C. M (2010) Temporal and spatial distribution of leishmaniasis in humans and dogs from Belo Horizonte-MG, 1993-2007. *Arq Bras Med Vet Zootec* 62: 1062-1071.
- Prefeitura de Belo Horizonte (2012) Leishmaniose visceral Belo Horizonte. Available: http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/cep/comunidade.do?evento=portlet&pldPle=cepTaxonomiaMenuPorta&app=saudef&tax=16045&lang=pt_BR&pg=5571&txp=08.
- Silva ES, Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF, Schallig HJDFH, et al. (2006) Diagnosis of Canine Leishmaniasis in the Endemic Area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by Parasite, Antibody and DNA Detection Assays. *Veterinary Research Communications* 30: 637-643.
- Voller A, Bartlett A, Bidwell DE (1976) Enzyme immunoassays for parasitic disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 70: 98-106.
- Shaw JJ, Voller A (1964) The detection of circulating antibody to kala-azar by means of immunofluorescent techniques. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 58: 349-352.

26. Camargo EP (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 6: 93–100.
27. Degreve W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U (1994) Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - A minireview. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 89: 463–469.
28. Andrade ASR, Gomes RF, Fernandes O, de Melo MN (2001) Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. *Acta Tropica* 78: 261–267.
29. Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, et al. (2001) Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8: 828–831.
30. Alves CF, de Amorim IFG, Moura EP, Ribeiro RR, Alves CF, et al. (2009) Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128: 349–358.
31. Bern C, Maguire JH, Alvar J (2008) Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2.
32. Costa CHN (2008) Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cadernos De Saude Publica* 24: 2959–2963.
33. Oliveira CDL, Franco Moraes MH, Lins Machado-Coelho GL (2008) Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. *Cadernos De Saude Publica* 24: 2953–2958.
34. Barbosa-de-Daus R, dos Mares-Guia MI, Nunes AZ, Costa KM, Junqueira RG, et al. (2002) *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9: 1361–1366.
35. Troncardi MZ, Camargo JB, Machado JG, Lacheis SB, Langoni H (2009) *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 164: 118–123.
36. Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, et al. (2006) Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Veterinary Parasitology* 140: 231–238.
37. Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L (2001) Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 560–563.
38. Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J (2004) Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57: 1–88.
39. Xavier SC, Andrade HM, Monte SJH, Chiarelli IM, Lima WG, et al. (2006) Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Veterinary Research* 2: 1–7.
40. Fisa R, Riera C, Gallego M, Mambrés J, Portus M (2001) Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary Parasitology* 99: 105–111.
41. Manna L, Vitale F, Reale S, Camocchia S, Pavone LM, et al. (2004) Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 125: 251–262.
42. Lachaud I, Marchegui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, et al. (2002) Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 210–215.
43. Straus-Ayalá D, Jaffe CI, Burshtain O, Gonen I, Baneth G (2004) Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *Journal of Infectious Diseases* 189: 1729–1733.
44. Giamiccia M, Di Muccio T, Fiorentino E, Scalone A, Bongiorno G, et al. (2010) Longitudinal study on the detection of canine *Leishmania* infections by conjunctival swab analysis and correlation with entomological parameters. *Veterinary Parasitology* 171: 223–228.
45. Reithinger R, Lambson BE, Barker DG, Counihan H, Espinoza JC, et al. (2002) *Leishmania (Viannia)* spp. dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96: 76–78.
46. Di Muccio T, Fiorentino E, Foglia MV, Capiello S, Oliva G, et al. (2008) The potential role of conjunctival swab analysis for the early detection of *Leishmania*-dog contacts: a preliminary study. *Parassitologia* 50: 1–2.
47. Pilati MM, Ferreira SdA, de Melo MN, Ribeiro de Andrade AS (2009) Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. *Research in Veterinary Science* 87: 255–257.
48. Carson C, Quinnell RJ, Holden J, Garcez LM, Deborggraeve S, et al. (2010) Comparison of *Leishmania* OligoC-Test PCR with Conventional and Real-Time PCR for Diagnosis of Canine *Leishmania* Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 3325–3330.
49. Galletti E, Bonilauri P, Bardasi L, Fontana MC, Ramini M, et al. (2011) Development of a minor groove binding probe based real-time PCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* in dog specimens. *Research in Veterinary Science* 91: 243–245.
50. Lombardo G, Pennista MG, Lupo T, Migliazzi A, Capria A, et al. (2011) Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology* In Press.
51. Quaresma PF, Fonseca Murta SM, Ferreira EdC, Vianna Mariano da Rocha-Lima AC, Prates Xavier AA, et al. (2009) Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica* 111: 289–294.
52. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, et al. (2006) Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science* 81: 68–75.
53. Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, et al. (2006) *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology* 142: 271–280.

ANEXO 3 - Ficha para análise clínica dos cães

SEXO DO ANIMAL:

DATA:

Achados mais frequentes em cães com LV, segundo Alvar, *et al.*, (2004) e Amusategui *et al.*, (2003):

	PRESENTE	AUSENTE
1) LINFOADENOPATIA		
1.1) Generalizada:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1.2) Localizada:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1.2.1) Linf. Submandibular:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1.2.2) Linf. Pré-escapular:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1.2.3) Linf. Poplíteo:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2) ANORMALIDADES LOCOMOTORAS		
3) SINAIS VISCERAIS		
3.1) Perda de peso:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.2) Fraqueza:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.3) Alterações gastrointestinais:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.4) Epistaxe:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.5) Uveíte:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4) SINAIS CUTÂNEOS		
4.1) Alopecia:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.2) Descamação:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.3) Hiperpigmentação:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.4) Eritema:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.5) Otite:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.6) Úlceras:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.7) Nódulos:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.9) Onicogribose:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.8) Pústulas:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.10) Lesões oculares:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.11) Conjuntivite	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5) LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES CUTÂNEAS		
5.1) Ao redor das orelhas/olhos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5.2) Face	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5.3) Membros	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5.4) Outras localizações	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5.5) Generalizada	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

COMENTÁRIOS

ANEXO 4 - Soluções utilizadas no ensaio imunoenzimático (ELISA)**Tampão Salina Fosfatada (PBS) concentrado 10 X**

Inicialmente, pesar os seguintes reagentes:

NaCl.....	21,25g
Na ₂ HPO ₄	3,30g
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O.....	0,39g

Dissolver os reagentes pesados em água destilada qsp 2500 mL.

Tampão Carbonato/Bicarbonato

Na ₂ CO ₃	1,59g
NaHCO ₃	2,93g

Dissolver os reagentes pesados em água destilada qsp 1000 mL. Esta solução permanece viável a 4°C por 15 dias.

Solução de Bloqueio

Tampão Salina Fosfatada.....	1000mL
Caseína.....	20g

Aquecer o Tampão a aproximadamente 90°C, adicionar a Caseína lentamente, agitando bastante com um bastão. Filtrar e conservar a -20°C.

Tampão de Incubação

Tampão Salina Fosfatada.....	1000mL
Tween 20.....	0,5mL
Caseína.....	2,5g

Aquecer o Tampão a aproximadamente 90°C adicionar a caseína lentamente, agitando bastante com um bastão. Filtrar, adicionar o Tween 20 e conservar a -20°C.

Tampão do Substrato

Na ₂ HPO ₄	7,19g
Ácido Cítrico.....	5,19 g
Água destilada.....	qsp 1000mL

Dissolver os elementos pesados na água destilada e conservar a 4°C.

Solução do Substrato

OPD.....	4µg
H ₂ O ₂	4µL
Tampão do Substrato.....	10mL

Preparar no momento do uso.

Ácido Sulfúrico 4N

H ₂ SO ₄ concentrado.....	480mL
H ₂ O.....	qsp 1000mL

Solução de Lavagem

NaCl.....	9g
Tween 20.....	0,5mL
H ₂ O.....	qsp 1000 mL

ANEXO 5 - Soluções utilizadas na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**Tampão Fosfato**

Na ₂ HPO ₄	17,8g
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O.....	10,3g
Água destilada.....	qsp 1000 mL

Misturar os reagentes pesados na água destilada. Conservar a 4°C.

Tampão Fosfato com Tween 2%

Tween 80.....	2 mL
Tampão Fosfato.....	100 mL

Misturar as duas soluções e dissolver a 37°C.

Salina Tamponada

Na ₂ HPO ₄	12g
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O.....	2,2g
NaCl.....	85g
Água destilada.....	1000mL

Dissolver os elementos sólidos na água destilada e conservar a solução produzida a 4°C.

Glicerina Tamponada

Tampão Fosfato.....	1mL
Glicerol.....	9mL

Misturar as duas soluções, conservando a solução obtida em 4°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamama-Moraitou KK, Rallis TS, Koytinas AF, Tontis D, Plevraki K, Kritsepi M 2007. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *Am J Trop Med Hyg* 76: 53-57.
- Altet L, Francino O, Solano-Gallego L, Renier C, Sanchez A 2002. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infect Immun* 70: 2763-2771.
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J 2004. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57: 1-88.
- Alvar J, Yactayo S, Bern C 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitol* 22: 552-557.
- Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, Team WLC 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Plos One* 7: 1-12.
- Alves WA, Bevilacqua PD 2004. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad. Saúde Pública Rio de Janeiro* 20: 259-265.
- Alves WA 2009a. Leishmaniasis: current situation in Brazil. *Bepa* 6: 25-29.
- Alves CF, Amorim IFG, Moura EP, Ribeiro RR, Alves CF, Michalick MS, Kalapothakis E, Romero O, Tafuri WL, Teixeira, MM, Melo MN 2009b. Expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 128: 349-358.
- Amela C, Mendez I, Torcal JM, Medina G, Pachon I, Canavate C, Alvar J 1995. Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Eur J Epidemiol* 11: 157-161.
- Amusatogui I, Sainz A, Rodriguez F, Tesouro MA 2003. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur J Epidemiol* 18: 147-156.
- Andrade ASR, Gomes RF, Fernandes O, MN 2001. Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in MinasGerais, Brazil. *Acta Trop* 3: 261-267.
- Andrade HM, Reis AB, Santosa SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ 2006. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally infected dogs. *Vet Parasitol* 140: 231-238.
- Arias JR, Monteiro PS, Zicker F 1996. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis* 2: 145-146.
- Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulalio MD, Sampaio DP, Badaro R 1998. Studies on control of visceral leishmaniasis: Impact of dog

- control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 59: 53-57.
- Babakhan L, Mehdi Mohebbali M, Akhoundi B, Edrissian GH, Keshavarz H 2009. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: a comparative study using fast agglutination screening test (FAST) and direct agglutination test (DAT) in Iran. *Parasitol Res* 105: 717-720.
- Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, David JR, Reed SG 1996. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 173.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L 2008. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 24: 324-330.
- Barbosa-de-Deus R, Mares-Guia ML, Nunes AZ, Costa KM, Junqueira RG, Mayrink W, Genaro O, Tavares CAP 2002. *Leishmania major*-Like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 1361-1366.
- Bates PA 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 37: 1097-1106.
- Bell AS, Ranford-Cartwright LC 2002. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol* 18: 337-342.
- Bern C, Maguire JH, Alvar J 2008. Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. *Plos Neglected Trop Dis* 2: 1-8.
- Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 55: 273-277.
- Bevilacqua PD, Paixao HH, Modena CM, Castro MCPS 2001. Urbanization of visceral leishmaniose in Belo Horizonte, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 53: 1-8.
- Blavier A, Keroack S, Denerolle P, Goy-Thollot I, Chabanne L, Cadore JL, Bourdoiseau G 2001. Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet J* 162: 108-120.
- Boussaa S, Guernaoui S, Pesson B, Boumezzough A 2005. Seasonal fluctuations of phlebotomine sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the urban area of Marrakech, Morocco. *Acta Trop* 95: 86-91.
- Braga MDM, Coelho ICB, Pompeu ML, Evans TG, MacAullife IT, Teixeira MJ, Lima JWO 1998. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme

- assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 419-424.
- Brasil 2003. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 120p.
- Brasil 2006. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, Brasil: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 182 p.
- Brasil 2009. Guia de vigilância epidemiológica, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde. 7ed., Brasília, p. 816.
- Brasil 2010a. Leishmaniose Visceral - situação epidemiológica. In Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.
- Brasil 2010b. Nota técnica da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e da Secretaria de Estado de Saúde do Rio Grande do Sul sobre a situação da leishmaniose visceral na fronteira do estado do Rio Grande do Sul com a Argentina. In CGdDT, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.
- Burns J, JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90.
- Caiaffa WT, Almeida MC, Oliveira CD, Friche AA, Matos SG, Dias MA, Cunha Mda C, Pessanha E, Proietti FA 2005. The urban environment from the health perspective: the case of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Cad Saude Publica* 21: 958-967.
- Cañavate C, Cruz I, Flores M 2005. Leishmaniosis canina: diagnóstico. *Información Veterinária: La leishmaniosis canina*, 1ª parte, p. 28-32, 2005
- Carson C, Quinnell RJ, Holden J, Garcez LM, Deborggraeve S, Courtenay O 2010. Comparison of *Leishmania* OligoC-Test PCR with conventional and real-time PCR for diagnosis of canine *Leishmania* infection. *J Clin Microbiol* 48: 3325-3330.
- Chargui N, Haouas N, Gorchii M, Akrouit Messaidi F, Zribi M, Babba H 2007. Increase of canine leishmaniasis in a previously low-endemicity area in Tunisia. *Parasite* 14: 247-251.
- Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 141: 539-543.
- Costa CH, Vieira JB 2001. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 223-228.

- Costa-Val AP, Cavalcanti RR, Gontijo NDF, Michalick MSM, Alexander B, Williams P, Melo MN 2007. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet J* 174: 636-643.
- Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C 2002. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 186: 1314-1320.
- Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MCA, Tramontano N 1985. A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 80: 17-22.
- Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, Jiménez-Mejías M, Sirera G, Videla S, Alvar J 2002. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: S1/185-S181/189.
- Cunha AM, Chagas E 1937. New species of protozoa of the genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi* n. sp previous note. *O. Hospital* 11: 3-9.
- Dantas-Torres F 2006. Final comments on an interesting taxonomic dilemma: *Leishmania infantum* versus *Leishmania infantum chagasi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 929-930.
- Dantas-Torres F 2007. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 149: 139-146.
- Dar L, Khan BK 2004. The Role of in-vitro Isotopic Techniques in Molecular Biology. *World J Nucl Med* 3: 72-81.
- Deane LM 1956. *Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará*, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 162 pp.
- Deane LM, Deane MP 1962. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 4: 198-212.
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 463-469.
- Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J 1995. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol* 17: 451-458.

- Desjeux P 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol* 14: 417-423.
- Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318.
- Di Muccio T, Fiorentino E, Manzillo VF, Cappiello S, Oliva G, Gradoni LI, Gramiccia M 2008. The potential role of conjunctival swab analysis for the early - detection of *Leishmania*-dog contacts: a preliminary study. *Parassitologia* 50: 154.
- Dietze R 2005. Diagnóstico sorológico e parasitológico da leishmaniose visceral. In *Consulta de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis visceral en las Américas*. Organización Panamericana de la Salud, Rio de Janeiro, p. 63-65.
- Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, Corey R 1997. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis* 25: 1240-1242.
- Duncan AW, Maggi RG, Breitschwerdt EB 2007. *Bartonella* DNA in dog saliva. *Emerg Infect Dis* 13: 1948-1950.
- Dye C 1996. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg* 55: 125-130.
- Evans D 1989. *Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of Leishmania*, World Health Organization, Geneva, 45 pp.
- Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, Schallig H, Gontijo CMG. 2007. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations *Vet Parasitol* 146: 235-241.
- Ferreira EC, Gontijo CM, Cruz I, Melo MN, Silva AM 2010. Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in endemic areas for leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 895-898.
- Ferreira SA, Ituassu LT, Melo MN, Andrade ASR 2008. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 152: 257-263.
- Ferrer L 1999. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*, Barcelona. Wiesbaden, Hoechst Roussel Vet, p. 6-10.
- Ferroglio E, Maroli M, Gastaldo S, Mignone W, Rossi L. 2005. Canine leishmaniasis, Italy. *Emerging Infect Dis* 11: 1618-1620.
- Ferroglio E, Centaro E, Mignone W, Trisciuglio A 2007. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in

- dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Vet Parasitol* 144: 162-166.
- Figueroa RA, Lozano LE, Romero IC, Cardona MT, Prager M, Pacheco R, Diaz YR, Tellez JA, Saravia NG 2009. Detection of *Leishmania* in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)* species. *J Infect Dis* 200: 638-646.
- Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrió J, Gállego J, Portús M. 1999. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* 83: 87-97.
- Fisa R, Riera C, Gallego M, Manubens J, Portus M 2001. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol* 99: 105-111.
- França-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, da Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E 2003. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 111: 161-173.
- Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sanchez A, Roura X 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 137: 214-221.
- Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP, Michalick MS 2006. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol* 137: 159-167.
- Freitas JC, Lopes-Neto BE, de Abreu CR, Coura-Vital W, Braga SL, Reis AB, Nunes-Pinheiro DC 2012. Profile of anti-*Leishmania* antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 93: 705-709.
- Galletti E, Bonilauri P, Bardasi L, Fontana MC, Ramini M, Renzi M, Dosa G, Meriardi G 2011. Development of a minor groove binding probe based real-time PCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* in dog specimens. *Res Vet Sci* 91: 243-245.
- Genaro O 1993. *Leishmaniose visceral canina experimental*, PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais. 202pp.
- Genaro O, et al 1997. Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis of dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi*, in Brasil. *Tuérk Parazitol Derg* 21: 1.
- Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB 2006. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Patho* 135: 100-107.

- Giunchetti RC, Mayrink W, Carneiro CM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB 2008. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 84: 269-277.
- Gomes AHS, Ferreira IMR, Lima MLSR, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MFL, Pereira-Chiocola VL 2007. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 144: 234-241.
- Gomes YM, Cavalcanti MP, Lira RA, Abath FGC, Alves LC 2008. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *Vet J* 175: 45-52.
- Gontijo CMF, Melo MN 2004. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Rev Bras Epidemiol* 7: 338-349.
- Gothe R, Nolte I, Kraft W 1997. Leishmaniasis in dogs in Germany: epidemiological case analysis and alternatives to conventional causal therapy. *Tierarztl Prax* 25: 68-73.
- Gradoni L 2002. The diagnosis of canine leishmaniasis. In *Proceedings*. 2nd Int. Canine Leishmaniasis Forum, p. 7-14.
- Gramiccia M, et al 2010. Longitudinal study on the detection of canine *Leishmania* infections by conjunctival swab analysis and correlation with entomological parameters. *Vet Parasitol* 171: 223-228.
- Grimaldi G, Jr., Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto IS, de-Azevedo CT, Falqueto A 2012. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP^(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 106: 54-59.
- Guarga JL, Lucientes J, Peribáñez MA, Molina R, Gracia MJ, Castillo JA 2000. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Trop* 77: 203-207.
- Harden SV, David C, Thomas DC, Benoit N, Minhas K, Westra WH, Califano JA, Koch W, Sidransky D 2004. Real-time gap ligase chain reaction a rapid semiquantitative assay for detecting p53 mutation at low levels in surgical margins and lymph nodes from resected lung and head and neck tumors *Clin Cancer Res* 10: 2379-2385.
- Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH 2011. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol* 27: 403-409.
- Headington CE, Barbara CH, Lambson BE, Hart DT, Barker DC 2002. Diagnosis of leishmaniasis in Maltese dogs with the aid of the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96 Suppl 1: S195-197.
- Herwaldt BL 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199.

- Hofman V, Brousset P, Mougneau E, Marty P, Lamant L, Antoine JC, Glaichenhaus N, Hofman P 2003. Immunostaining of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* using monoclonal antibody (10–11) to the *Leishmania* homologue of receptors for activated C-kinase. *Am J Clin Pathol* 120: 567-574.
- Iniesta L, Gallego M, Portús M 2005. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol* 103: 77-81.
- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML 1997. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5ed, Academic Press, 932 pp.
- Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG 1999. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc* 35: 376-383.
- Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P 2002b. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 40: 210-215.
- Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP, Bastien P 2002a. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology* 125: 197-207.
- Lainson R, Shaw JJ 1998. New World Leishmaniasis. The Neotropical *Leishmania* species. In FEG Cox, JP Kreier, D Wakelin (eds), Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th ed., Vol. 5 *Parasitology*, Arnold, London, p. 242-266.
- Lainson R, Rangel EF 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 811-827.
- Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW 2003. *Duncan and Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology*, 4ed, Iowa, Iowa State Press, 450pp.
- Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romão P, Cortes S, Rolão N, Gomes-Pereira S, Riça Capela MJ, Abranches P 2001. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 79: 273-284.
- Leblois R, Kuhls K, Francois O, Schonian G, Wirth T 2011. Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi*. *Infect Genetics Evolution* 11: 1091-1095.
- Leite RS, Ferreira SA, Ituassu LT, Melo MN, Andrade ASR 2010. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Vet Parasitol* 170: 201-206.
- Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MAB, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri S, Dietze R 2008. Canine visceral leishmaniasis: Performance of a rapid diagnostic

- test (Kalazar DetectTM) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Trop* 107: 205-207.
- Lima LVR, Carneiro LA, Campos MB, Chagas EJ, Laurenti MD, Corbett CEP, Lainson R, Silveira FT 2010. Canine Visceral Leishmaniasis due to *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Amazonian Brazil: Comparison of the parasite density from the skin, lymph node and visceral tissues between symptomatic and asymptomatic, seropositive dogs. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 52: 259-265.
- Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Migliazzo A, Capri A, Solano-Gallego L 2011. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Vet Parasitol* 184: 10-17.
- Lopes EGP, Magalhães DF, Silva JA, Haddad JPA, Moreira EC 2010. Temporal and spatial distribution of leishmaniasis in humans and dogs from Belo Horizonte-MG, 1993-2007 *Arq Bras Med Vet Zootec* 62: 1062-1071.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Randall RJ 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Luz ZMP, Pimenta DN, Cabral ALLV, Fiúza VOP, Rabello A 2001. Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 249-254.
- Madeira MF, et al 2009a. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology* 136: 411-423.
- Madeira MF 2009b. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Is intact skin a good target? *Res Vet Sci* 87: 260-262.
- Maia-Elkhoury AN, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA 2008. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica* 24: 2941-2947.
- Maia C, Campino L 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 158: 274-287.
- Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J* 179: 142-144.
- Mancianti F, Tardoni S, Melosi M 2002. Evaluation of the effectiveness of commercial immunomigration tests in the diagnosis of canine leishmaniasis. *Parasitologia* 44: 99.
- Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A 1995. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 59.

- Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 125: 251-262.
- Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, Michele PL, Caracappa S, Gravino AE. 2006. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet Parasitol* 142: 271-280.
- Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, Gravino AE 2008a. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J* 177: 279-282.
- Manna L, Reale S, Picillo E, Vitale F, Gravino AE 2008b. Urine sampling for real-time polymerase chain reaction based diagnosis of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest* 20: 64-67.
- Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH, Pessanha JE, Dias ES 2006. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 31-38.
- Martínez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O, Altet L 2011. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasite Vectors* 4: 2-5.
- Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H 2004. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 42: 5249-5255.
- Maurício IL, Stothard JR, Miles MA 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16: 188-189.
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol* 43: 5515-5519.
- Miles MA, Vexenat JA, Campos JHF, Castro JAD 1999. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*, Barcelona. Wiesbaden, Hoechst Roussel Vet, p. 46-53.
- Mimori T, Matsumoto T, Calvopina MH, Gomez EA, Saya H, Katakura K, Nonaka S, Shamsuzzaman SM, Hashiguchi Y 2002. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Acta Trop* 81: 197-202.

- Miranda S, Roura X, Picado A, Ferrer L, Ramis A 2008. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Res Vet Sci* 85: 35-38.
- Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G 2008. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol* 24: 371-377.
- Mohebbali M, Malmasi A, Hajjarian H, Jamshidi S, Akhoundi B, Rezaei M, Janitabar S, Zarei H, Charehdar S 2011. Disseminated leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in a puppy from Karaj, Central Iran. *Iranian J Parasitol* 6: 69-73.
- Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 491-493.
- Moreira ED, Souza VMM, Sreenivasan M, Nascimento EG, Carvalho LP 2004. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet Parasitol* 122: 245-252.
- Moreira MAB, Luvizotto MCR, Garcia JF, Corbett CEP, Laurenti MD 2007. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol* 145: 245-252.
- Moreno J, Alvar J 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitol* 18: 399-405.
- Morillas F, Sanchez Rabasco F, Ocana J, Martin-Sanchez J, Ocana-Wihelmi J, Acedo C, Sanchiz-Marin MC 1996. Leishmaniosis in the focus of the Axarquia region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitol Res* 82: 569-570.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-1577.
- Murta SM, et al 2006. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 146: 151-162.
- Nasereddin A, Ereqat S, Azmi K, Baneth G, Jaffe CL, Abdeen Z 2006. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. *J Parasitol* 92: 178-183.
- Nejjar R, Lemrani M, Malki A, Ibrahimy S, Amarouch H, Benslimane A 1988. Canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum* MON-1 in northern Morocco. *Parasite* 5: 325-330.

- Nicolle C, Comte C 1908. Origine canine du Kala-azar. *Bull Soc Pathol Exot 1*: 299-301.
- Nieto CG, Garcia-Alonso M, Requena JM, Miron C, Soto M, Alonso C, Navarrete I 1999. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol 67*: 117-130.
- Noli C 1999. *Canine leishmaniasis*, Vol. 9, Waltham Focus. 16-24.
- Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Goncalves J, Perri SHV 2010. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet Parasitol 170*: 131-133.
- Oliva G, Scalone A, Manzillo VF, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L 2006. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol 44*: 1318-1322.
- Oliveira CD, Morais MH, Machado-Coelho GL 2008. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. *Cad Saude Publica 24*: 2953-2958.
- Oshaghi MA, Rasolian M, Shirzadi MR, Mohtarami F, Doosti S 2010. First report on isolation of *Leishmania tropica* from sandflies of a classical urban cutaneous leishmaniasis focus in southern Iran. *Exp Parasitol 126*: 445-450.
- Oskam L, Slappendel RJ, Beijer EGM, Kroon NCM, van Ingen CW, Özensoy S, Özbel Y, Terpstra WJ 1996. Dog-DAT: a direct agglutination test using stabilized, freeze-dried antigen for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *FEMS Immunol Med Microbiol 16*: 235-239.
- Paiva-Cavalcanti M, Regis-da-Silva CG, Gomes YM 2010. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. *J Venomous Animals Toxins Trop Dis 14*: 537-542.
- Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, Franca-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O 2001. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg 65*: 510-517.
- Paltrinieri S, et al 2010. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc 236*: 1184-1191.
- Papadopoulou C, Kostoula A, Dimitriou D, Panagiou A, Bobojianni C, Antoniadis G 2005. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *J Infect 50*: 53-60.

- Paranhos-Silva M, Freitas LA, Santos WC, Grimaldi GJ, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ 1996. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 55: 39-44.
- Paranhos-Silva M, Nascimento EG, Melro MC, Oliveira GG, dos Santos WL, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ 1998. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Trop* 69: 75-83.
- Peacock CS, et al 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 39: 839-847.
- Peña MT, Naranjo C, Klauss G, Fondevila D, Leiva M, Roura X, Davidson MG, Dubielzig RR 2008. Histopathological features of ocular leishmaniosis in the dog. *J Comp Pathol* 138: 32-39.
- Penna HA 1934. Visceral leishmaniasis in Brazil. *Brasil-Médico* 48: 949-950.
- Pennisi MG, Reale S, Giudice SL, Masucci M, Caracappa S, Vitale M, Vitale F 2005. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Vet Res Commun* 29 Suppl 2: 301-303.
- Petanides TA, et al 2008. Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med* 22: 866-872.
- Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, Toga B, Quilici M 1994. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 32: 746-749.
- Piarroux R, Azaiez R, Lossi AM, Reynier P, Muscatelli F, Gambarelli F, Fontes M, Dumon H, Quilici M 1993. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence of *Leishmania infantum*: development of visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 49: 364-369.
- Pilatti MM, Ferreira S A, de Melo MN, de Andrade AS 2009. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. *Res Vet Sci* 87: 255-257.
- Piscopo TV, Mallia AC 2006. Leishmaniasis. *Postgrad Med J* 82: 649-657.
- Plevraki K, Koutinas AF, Kaldrymidou H, Roumpies N, Papazoglou LG, Saridomichelakis MN, Savvas I, Leondides L 2006. Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med* 20: 228-233.
- Porrozzi R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, Fernandes AP, Gazzinelli RT, Campos-Neto A, Grimaldi G, Jr 2007. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and

- asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol* 14: 544-548.
- Quaresma PF, Murta SM, Ferreira Ede C, da Rocha-Lima AC, Xavier AA, Gontijo CM 2009. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop* 111: 289-294.
- Queiroz NM, da Silveira RC, de Noronha AC, Jr., Oliveira TM, Machado RZ, Starke-Buzetti WA 2011. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. *Vet Parasitol* 178: 1-8.
- Queiroz PV, Monteiro GR, Macedo VP, Rocha MA, Batista LM, Queiroz JW, Jeronimo SM, Ximenes MF 2009. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. *Res Vet Sci* 86: 267-273.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C 1997. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology* 115: 143-156.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, Shaw JJ, Shaw MA, Dye C 2001. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology* 122: 253-261.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, Day MJ 2003a. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 91: 161-168.
- Quinnell RJ, Kennedy LJ, Barnes A, Courtenay O, Dye C, Garcez LM, Shaw MA, Carter SD, Thomson W, Ollier WE 2003b. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics* 55: 23-28.
- Quinnell RJ, Courtenay O 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136: 1915-1934.
- Rallis T, Day MJ, Saridomichelakis MN, Adamama-Moraitou KK, Papazoglou L, Fytianou A, Koutinas AF 2005. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *J Comp Pathol* 132: 145-152.
- Rami M, Atarhouch T, Sabri M, Cadi Soussi M, Benazzou T, Dakkak A 2003. Canine leishmaniasis in the Rif mountains (Moroccan Mediterranean coast): a seroepidemiological survey. *Parasite* 10: 79-85.
- Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G 1999. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J Clin Microbiol* 37: 2931-2935.

- Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, Franca-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Correa-Oliveira R 2006a. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 81: 68-75.
- Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, Guerra LL, Andrade RA, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA 2006b. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 112: 102-116.
- Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL, Correa-Oliveira R 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 128: 87-95.
- Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Davies CR 2000. Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in dog blood and bone marrow. *J Clin Microbiol* 38: 748-751.
- Reithinger R, Davies CR 2002. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends in Parasitol* 18: 289-290.
- Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR 2002a. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol* 40: 2352-2356.
- Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Counihan H, Espinoza CJ, Gonzalez JS, Davies CR 2002b. *Leishmania* (*Viannia*) spp. dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 76-78.
- Reithinger R, Dujardin JC 2007. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol* 45: 21-25.
- Rocha MN, Margonari C, Presot IM, Soares RP 2010. Evaluation of 4 polymerase chain reaction protocols for cultured *Leishmania* spp. typing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 68: 401-409.
- Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, Francino O, López-Fuertes L, Timón M, Alberola J 2010. *Leishmania* Infection: Laboratory Diagnosing in the Absence of a “Gold Standard”. *Am J Trop Med Hyg* 82: 251-256.
- Rolão N, Martins MJ, Joao A, Campino L 2005. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite* 12: 183-186.
- Rondon FC, Bevilaqua CM, Franke CR, Barros RS, Oliveira FR, Alcantara AC, Diniz AT 2008. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceara state, Brazil. *Vet Parasitol* 155: 24-31.

- Rosário EY, Genaro O, França-Silva JC, Costa RT, Mayrink W, Reis AB, Carneiro M 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 197-203.
- Rosati S, Ortoffi M, Profiti M, Mannelli A, Mignone W, Bollo E, Gradoni L 2003. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 1153-1156.
- Ross R 1903. Further notes on *Leishmania's* bodies. *BMJ* 11: 1401.
- Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS 2005. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J Parasitol* 91: 970-972.
- Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T 1982. Gel eletrophoresis: Polyacrylamide gel eletrophoresis. In *Molecular Cloning: a laboratory manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 173-180.
- Sánchez-García L, Berzunza-Cruz M, Becker-Fauser I, Rebollar-Téllez EA 2010. Sand flies naturally infected by *Leishmania (L.) mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104: 406-411.
- Sánchez CA, Sanchez JM, Bernal IDV, Marin MCS, Louassini M, Maldonado JA, Marquez FM 1996. Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada province, southern Spain). *Int J Parasitol* 26: 303-310.
- Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI 2005. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am J Trop Med Hyg* 73: 82-86.
- Scalone A, et al 2002. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol* 104: 275-285.
- Schallig HDFH, Schoone GJ, Kroon CCM, Hailu A, Chappuis F, Veeken H 2001. Development and application of simple diagnostic tools for visceral leishmaniosis. *Med. Microbiol. Immunol. Med Microbiol Immunol* 190: 69-71.
- Schallig HDFH, Schoone GJ, Beijer EGM, Kroon CCM, Hommers M, Özbel Y, Özensoy S, Silva ES, Cardoso LM, Silva ED 2002. Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Vet Parasitol* 109: 1-8.
- Schoone GJ, Hailu A, Kroon CC, Nieuwenhuys JL, Schallig HD, Oskam L 2001. A fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 400-401.

- Shaw J, Voller A 1964. The detection of circulating antibody to kala-azar by means of immunofluorescent techniques. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 58: 349-352.
- Shaw JJ 2007. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 541-547.
- Shaw SE, Day MJ, Birtles RJ, Breitschwerdt EB 2001. Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol* 17: 74-80.
- Shaw SE, Lerga AI, Williams S, Beugnet F, Birtles RJ, Day MJ, Kenny MJ 2003. Review of exotic infectious diseases in small animals entering the United Kingdom from abroad diagnosed by PCR. *Vet Rec* 152: 176-177.
- Sideris V, Papadopoulou G, Dotsika E, Karagouni E 1999. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur J Epidemiol* 15: 271-276.
- Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, Fiuza VO, Brazil RP 2001a. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 285-291.
- Silva ES, Gontijo CMF, Pirmez C, Fernandes O, Brazil RP 2001b. Short Report: Detection of *Leishmania* DNA by Polymerase Chain Reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 65: 896-898.
- Silva ES, van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CM, Schallig HD, Brazil RP 2006. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet Res Commun* 30: 637-643.
- Silva SM, Ribeiro VM, Ribeiro RR, Tafuri WL, Melo MN, Michalick MS 2009a. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Vet Parasitol* 166: 159-162.
- Silva FL, Oliveira RG, Silva TM, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL 2009b. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 160: 55-59.
- Silva SM, Rabelo PF, Gontijo Nde F, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, Michalick MS 2010. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Vet Parasitol* 174: 150-154.
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CE 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 239-251.
- Singh SP, Reddy DCS, Rai M, Sundar S 2006a. Serious underreporting of visceral leishmaniasis through passive case reporting in Bihar, India. *Trop Med Int Health* 11: 899-905.

- Singh S 2006b. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123: 311-330.
- Slappendel RJ 1988. Canine Leishmaniasis - a review based on 95 cases in the Netherlands. *Vet Q* 10: 1-16.
- Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L 2000. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 90: 37-45.
- Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L 2001a. Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. *J Clin Microbiol* 39: 560-563.
- Solano-Gallego L, et al 2001b. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol* 96: 265-276.
- Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J 2007. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet Parasitol* 147: 315-319.
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 165: 1-18.
- Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G 2004. Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples, for the Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs. *J Infect Dis* 189: 1729-1733.
- Sundar S, Rai M 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 951-958.
- Tafuri WL, Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WT 2001. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol* 96: 203-212.
- Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Goncalves R, Melo MN, Michalick MS, Tafuri WL 2004. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods* 292: 17-23.
- Tarallo VD, Dantas-Torres F, Lia RP, Otranto D 2010. Phlebotomine sand fly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in southern Italy. *Acta Trop* 116: 227-234.

- Tavares CA, Fernandes AP, Melo MN 2003. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn* 3: 657-667.
- Teske E, van Knapen F, Beijer EG, Slappendel RJ 2002. Risk of infection with *Leishmania* spp. in the canine population in the Netherlands. *Acta Vet Scand* 43: 195-201.
- Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y 2001. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: Relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg* 64: 119-124.
- Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H 2009. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 164: 118-123.
- Vaish M, Mehrotra S, Chakravarty J, Sundar S 2011. Noninvasive molecular diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 49: 2003-2005.
- Vieira JB, Coelho GE 1998. Visceral leishmaniasis or kala-azar: the epidemiological and control aspects. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 85-92.
- Voller A, Bartlett A, Bidwell DE 1976. Enzyme immunoassays for parasitic disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 70: 98-106.
- Werneck GL 2008. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Cad Saude Publica* 24: 2937-2940.
- Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH 2007. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiol Infect* 135: 195-201.
- WHO 2010. *Control of the Leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis*, WHO Press, Geneva, 201 pp.
- WHO 2012. [homepage on the Internet]. Geneva: Leishmaniasis: worldwide epidemiological and drug access update, [updated 2012 May 30; cited 2012 Jun 20]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html>.
- Xavier SC, Andrade HM, Jamil S, Monte H, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MSM, Tafuri WL, Tafuri WL 2006. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res* 2: 1-7.