



LOREDANA NILKENES GOMES DA COSTA

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA O DIAGNÓSTICO E
MONITORAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E
VISCERAL NA REGIÃO DE CAMPINAS-SP E DE TERESINA-PI**

**Campinas
2014**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas**

LOREDANA NILKENES GOMES DA COSTA

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA O DIAGNÓSTICO E
MONITORAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E VISCERAL
NA REGIÃO DE CAMPINAS-SP E DE TERESINA-PI**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Carlos Emílio Levy

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA LOREDANA NILKENES GOMES DA COSTA E ORIENTADA PELO PROFESSOR DR. CARLOS EMÍLIO LEVY.

Assinatura do(a) Orientador(a)

**Campinas
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C823a Costa, Loredana Nilkenes Gomes da, 1986-
Aplicação da técnica de PCR para o diagnóstico e monitoramento da leishmaniose tegumentar e visceral na região de Campinas-SP e Teresina-PI / Loredana Nilkenes Gomes da Costa. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Carlos Emílio Levy.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leishmania. I. Levy, Carlos Emílio, 1949-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Application of PCR for the diagnosis and monitoring of cutaneous and visceral leishmaniasis in the region of Campinas-SP and Teresina-PI

Palavras-chave em inglês:

Leishmaniasis

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Carlos Emílio Levy [Orientador]

Aparecida Helena Souza Gomes

Djalma de Carvalho Moreira Filho

Data de defesa: 30-04-2014

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

FOLHA DE APROVAÇÃO

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LOREDANA NILKENES GOMES DA COSTA

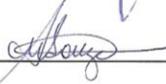
Orientador (a) PROF(A). DR(A). CARLOS EMÍLIO LEVY

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). CARLOS EMÍLIO LEVY



2. PROF(A). DR(A). APARECIDA HELENA SOUZA GOMES



3. PROF(A). DR(A). DJALMA DE CARVALHO MOREIRA FILHO



Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 30 de abril de 2014

ABSTRACT

BACKGROUND: Leishmaniasis is a group of parasitic diseases caused by over twenty species of trypanosomes of the genus *Leishmania*. Affect animals (wild and domestic) and man. In Brazil is a disease with many agents, reservoirs and vectors presenting different patterns of transmission and there is still limited knowledge on some epidemiological aspects, which makes it difficult to control. **OBJECTIVE:** Using PCR for leishmaniasis diagnostic purposes, from human clinical samples (Campinas) and canine samples coming from the cities of Campinas/SP and Teresina/PI. **METHODS:** In the Laboratory of Parasitology of the Hospital de Clinicas Unicamp, 120 human samples and 195 canine samples were processed. PCR was performed using primers specific for the genus *Leishmania* ssp. and for *L. (L.) infantum chagasi* and *L. (V.) braziliensis* species. **RESULTS:** Among the 120 human samples, 80 were suspected of leishmaniasis (obtained 43 from bone marrow biopsies and 37 from cutaneous lesion scrapings). Of these 80 samples, only 15 were positive on direct testing, 9 were positive in culture and 20 were positive for PCR for *Leishmania* genus. As control were used 40 samples, all negative for PCR. The 15 samples that were positive in the direct examination were also positive in PCR, 7 identified as *L. (L.) infantum chagasi*, 7 *L. (V.) braziliensis* and only 1 positive for genus *Leishmania* and negative for *L. (L.) i. chagasi* or *L. (V.) braziliensis* coming from a sample of bone marrow aspiration. The PCR performed in canine samples compared to the screening test showed difference in sensitivity in both cities. In Campinas was obtained higher sensitivity of PCR (88.24 %) [$p = 0.0455$] when compared with the series in Teresina (14.71 %) [$p < 0.0001$]. When compared PCR with the confirmatory testing, discordant results were found between PCR and ELISA ($p = 0.0027$ for Campinas and $p < 0.0001$ for Teresina) for values of sensitivity (100 % = Campinas/Teresina = 21.74 %), specificity (Campinas = 30.77 %/Teresina = 100 %), PPV (Campinas = 68.97 %/Teresina = 100 %) and VPN (Campinas = 100 %/ Teresina = 37.94 %). **DISCUSSION AND CONCLUSION:** PCR showed excellent agreement with the gold standard test for the diagnosis of human VL and TL with high sensitivity and specificity. It was possible to prove the absence of cross-reactivity of the primers with other phylogenetically close parasites. PCR is presented as a tool of considerable value to identify the species involved in infections in dogs and humans. In the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in cities with epidemiological profile like Campinas, where the outbreak appears to be more recent, the performance of PCR proved to be very useful for the detection of infected dogs. In this population the screening test was more sensitive and specific than the confirmatory test, with the detection of the parasite DNA by PCR as reference. In the case of Teresina, with the probable pattern of endemic canine long-term illness, PCR was not useful for diagnosis, except for detection of few dogs with probable active parasitemia and antigenemia.

RESUMO

INTRODUÇÃO: As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias causadas por mais de vinte espécies de tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*. Afetam animais (silvestres e domésticos) e o homem. No Brasil é uma doença com diversos agentes, reservatórios e vetores que apresenta diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos epidemiológicos, o que a torna de difícil controle. **OBJETIVO:** Utilizar a técnica de PCR para fins diagnósticos de Leishmaniose, tanto de amostras clínicas humanas (Campinas), como de amostras caninas procedentes das cidades de Campinas/SP e Teresina/PI. **MÉTODOS:** Foram encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia do Hospital de Clínicas da Unicamp, 120 amostras humanas e 195 amostras caninas. A PCR foi realizada utilizando primers específicos para o gênero *Leishmania ssp.* e para as espécies *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) braziliensis*. **RESULTADOS:** Das 120 amostras humanas, 80 eram suspeitas de leishmaniose (43 obtidas de medula óssea e 37 de biópsias e/ou raspado de lesão tegumentar). Destas, 15 foram positivas na pesquisa direta e apenas 9 foram positivas na cultura e 20 apresentaram PCR positivo para gênero. Foram utilizadas 40 amostras como controle, sendo todas negativas para o PCR. As 15 amostras que foram positivas na pesquisa direta apresentaram positividade na PCR, sendo 7 identificadas como *L. (L.) infantum chagasi*, 7 *L. (V.) braziliensis* e 1 positiva apenas para o gênero *Leishmania*, esta sendo procedente de amostra de punção de medula óssea. A PCR realizada nas amostras caninas, quando comparada ao teste de triagem mostrou diferença de sensibilidade do método nas duas cidades de estudo, sendo que em Campinas foi observada maior sensibilidade da PCR (88,24%) [$p=0,0455$] quando comparada a casuística de Teresina (14,71%) [$p<0.0001$]. Na comparação da PCR com o teste confirmatório foram encontrados resultados discordantes entre as técnicas de PCR e Elisa ($p=0.0027$ para Campinas e $p<0.0001$ para Teresina) para os valores de sensibilidade (Campinas=100%/Teresina=21,74%), especificidade (Campinas=30,77% / Teresina=100%), VPP (Campinas=68,97% / Teresina=100%) e VPN (Campinas=100% / Teresina=37,94%). **DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:** Para o diagnóstico de LV e LT em humanos a PCR mostrou excelente concordância com os testes padrão ouro, com elevada sensibilidade e especificidade. Foi possível comprovar a ausência de reações cruzadas dos primers utilizados com outros parasitos filogeneticamente próximos. A PCR apresenta-se como uma ferramenta de considerável valor para a identificação das espécies envolvidas nas infecções em cães e humanos. No diagnóstico da leishmaniose visceral canina em cidades com perfil epidemiológico como Campinas onde o surto parece ser mais recente, o desempenho da PCR mostra-se muito útil na detecção de cães infectados. Nesta população o teste de triagem se mostrou mais sensível e específico que o teste confirmatório, tendo como referência a detecção do DNA do parasito pela PCR. No caso de Teresina, com provável padrão de doença canina endêmica de longa duração a PCR não se mostrou útil para diagnóstico, exceto para detecção de poucos cães com provável parasitemia ativa ou antigenemia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	19
1.1.1 HISTÓRICO	19
1.1.2 EPIDEMIOLOGIA	22
1.1.3 AGENTE ETIOLÓGICO E HOSPEDEIROS	23
1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL	27
1.2.1 HISTÓRICO	27
1.2.2 EPIDEMIOLOGIA	28
1.2.3 AGENTE ETIOLÓGICO E HOSPEDEIROS	29
1.3 CICLO BIOLÓGICO DAS LEISHMANIOSES	31
1.4 DIAGNÓSTICO PADRÃO OURO DAS LEISHMANIOSES	33
1.5 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	35
1.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR E A IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES	36
2. OBJETIVOS	40
3. MATERIAL E MÉTODO	41
3.1 ASPÉCTOS ÉTICOS	41
3.2 LOCAL E DESENHO DO ESTUDO	42
3.3 AMOSTRAS HUMANAS	42
3.3.1 CONDIÇÕES DE COLETA E TRANSPORTE	43
3.3.2 EXTRAÇÃO DE DNA	43
3.3.2.1 Amostras de biópsias e raspado de lesão tegumentar	43
3.3.2.2 Amostras de aspirado de medula óssea	44
3.4 AMOSTRAS CANINAS	44
3.4.1 COLETA E TRANSPORTE DOS COÁGULOS	47
3.4.2 EXTRAÇÃO DE DNA	47
3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA GÊNERO E ESPÉCIES	47
3.6 DIAGNÓSTICO TRADICIONAL HUMANO	55
3.6.1 PESQUISA DIRETA EM AMOSTRAS DE LESÃO TEGUMENTAR	55
3.6.2 AMOSTRAS DE ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA	55
3.6.3 CULTURA DE LEISHMANIA	56

3.7 DIAGNÓSTICO TRADICIONAL CANINO	56
3.8 ANÁLISE DE DADOS	57
4. RESULTADOS	58
4.1 AMOSTRAS HUMANAS	58
4.2 AMOSTRAS CANINAS	63
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS	82

DEDICATÓRIA

A Deus.

AGRADECIMENTOS

ANGELA T. LAUAND TEIXEIRA - Farmacêutica - Supervisora do Laboratório de Parasitologia do HC Unicamp.

CELIA REGINA MENDES SALES - Bióloga do Laboratório de Parasitologia do HC Unicamp.

CHRISTIAN CRUZ HÖFLING - Médico Infectologista - Núcleo de Vigilância Epidemiológica. Serviço de Epidemiologia Hospitalar Hospital das Clínicas Unicamp.

FERNANDO LUIZ LIMA DE OLIVEIRA - Médico Veterinário - Doutorando e Mestre em Ciência Animal pela UFPI. Servidor da Fundação Municipal de Saúde. Responsável Técnico pelo diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina.

MARIA CLARA DUARTE FREGOLENTE – Ex-funcionária do Laboratório de Parasitologia do HC Unicamp.

MARIA LUIZA MORETTI - Médica Infectologista Coordenadora do Núcleo de Vigilância Epidemiológica. Serviço de Epidemiologia Hospitalar -Hospital das Clínicas – Unicamp.

MARCELO DE CARVALHO RAMOS – Prof. Dr. Associado da FCM/UNICAMP, Departamento de Clínica Médica, Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

PAULO VELHO - Médico Dermatologista – Prof. Dr. do Departamento de Clínica Médica Disciplina de Dermatologia FCM Unicamp.

RODRIGO NOGUEIRA ANGERAMI - Médico Infectologista - Núcleo de Vigilância Epidemiológica. Serviço de Epidemiologia Hospitalar -Hospital das Clínicas – Unicamp.

SELMA GIORGGIO – Bióloga, Profa. Dra do Instituto de Biologia da Unicamp.

SUELI OLIVEIRA - Técnica do Laboratório de Parasitologia do HC Unicamp.

VERA LUCIA PEREIRA CHIOCCOLA - Pesquisadora Científica do Instituto Adolfo Lutz.

Á todos os colaboradores do laboratório de Imunogenética do HC Unicamp.
Á Fundação Municipal de Saúde de Teresina, em especial a Dra. Amariles Borba e ao Enfermeiro Francisco Formiga de Sá Júnior.

Aos colaboradores do Centro de Zoonoses de Campinas, em especial ao Claudio Luiz Castagna, Médico Veterinário, Coordenador do Programa de controle da Leishmaniose Visceral.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Relação da forma clínica da LTA, espécies de <i>Leishmania</i> e as espécies de <i>Lutzomyia</i>	26
Quadro 2: Fluxograma das amostras caninas	46
Figura 1: Diagrama esquemático da organização de cada minicírculo de <i>Leishmania</i> e a localização dos iniciadores para gênero e para o grupo <i>L. donovani</i>	49
Figura 2: Diagrama esquemático gene RNA mini-exon (ou spliced leader -SL) de <i>Leishmania</i> e localização dos iniciadores que identificam <i>L.(V.) braziliensis</i>	51
Quadro 3: Sequências, temperaturas de anelamento e tamanho do amplicon de cada um dos iniciadores utilizados nas reações de PCR.	54
Figura 3: Fotos dos géis de agarose: A: Utilizados os iniciadores para o gênero <i>Leishmania</i> . B: Utilizados os iniciadores para a espécie <i>L. (L.) infantum chagasi</i> . C Utilizados os iniciadores para a espécie <i>L. (V.) braziliensis</i>	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos resultados da PCR, cultura e pesquisa direta de <i>Leishmania</i> em humanos.	60
Tabela 2. Comparação entre a PCR para o gênero <i>Leishmania</i> com pesquisa direta e cultura de amostras humanas.	61
Tabela 3. Descrição das PCRs realizadas, tipos de amostras humanas e resultados. ..	62
Tabela 4. Descrição do desempenho dos 3 testes avaliados nas duas cidades estudadas.	65
Tabela 5. Valores de referência da PCR quando comparada ao teste de triagem (teste rápido TR-DPP® imunocromatográfico) em amostras das duas cidades.	66
Tabela 6. Valores de referência da PCR quando comparada ao teste de confirmatório (ELISA) em amostras das duas cidades.	67
Tabela 7. Distribuição dos resultados dos testes e a localidade.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM: Amazonas

CCZ: Centros de Controle de Zoonoses

CE: controle endógeno

cut off: ponto de corte

d.C: idade depois de Cristo

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: deoxyribonucleotide triphosphates

DO: densidade óptica

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

HC: Hospital de Clínicas

HIV: Human Immunodeficiency Virus

IFI: Imunofluorescência Indireta

KDNA: ácido desoxirribonucleico oriundo do cinetoplasto

LCV: Leishmaniose Visceral Canina

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LT: Leishmaniose Tegumentar

LV: Leishmaniose Visceral

MSB: Ministério da Saúde do Brasil

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MO: medula óssea

NNN: meio Neal, Novy, Nicolle

NVE: Núcleo de Vigilância Epidemiológica

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PI: Piauí

QT-NASBA: Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Amplification

RNA: ácido ribonucleico

RPM: rotação por minuto

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

SL: spliced leader

SP: São Paulo

TA: temperatura de anelamento

TBE: Tris-Boro-EDTA

TR-DPP: Dual Path Platform

VPP: Valor Preditivo Positivo

VPN: Valor Preditivo Negativo

LISTA DE SÍMBOLOS

UI: Unidade Internacional

Kb: Kilobase

pb: pares de base

μL: microlitros

μg: microgramas

mL: mililitro

®: marca registrada

%: porcentagem

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias causadas por mais de vinte espécies de tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, cujo parasito digenético é transmitido por insetos vetores dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus*. Afetam animais silvestres e domésticos (zoonose) e acometem o homem de forma acidental nas regiões tropicais e subtropicais do Velho e do Novo Mundo causando alterações no sistema fagocitário mononuclear (1; 2). Está amplamente difundida no mundo, ocorrendo em 88 países tropicais e subtropicais, e pode, conforme a forma de acometimento do homem, ser dividida em dois grandes grupos: leishmaniose tegumentar e visceral (3).

A associação das leishmanioses com portadores de HIV e com mudanças no ambiente urbano permitem sua expansão nos tempos modernos. Hoje, as leishmanioses constituem a segunda maior doença infecciosa e endêmica no mundo (4; 5), representando um sério problema com impacto negativo para a saúde pública, com reflexos inclusive na economia, que pela mortalidade da forma visceral ou pelos aspectos mutilantes da forma tegumentar (6).

No Brasil é uma doença com diversos agentes, reservatórios e vetores que apresenta diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos epidemiológicos, o que a torna de difícil controle. Segundo o Ministério da Saúde, é importante a implantação de ações voltadas para o diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos detectados e estratégias de controle flexíveis, distintas e adequadas para cada padrão de transmissão (7). A complexidade do espectro clínico e as limitações dos métodos tradicionais de diagnóstico sugerem a utilização de recursos diagnósticos mais sensíveis e específicos. Estes recursos deverão ser úteis

para auxiliar nos casos inconclusivos e/ou naqueles que o diagnóstico laboratorial é dificultado pela escassez de parasitos e confirmando os casos positivos que permitam identificar a espécie envolvida para fins de monitoramento e de outros estudos epidemiológicos. Tendo em vista as limitações das técnicas atualmente empregadas no diagnóstico de leishmaniose em humanos e em seus reservatórios, há a necessidade de implantação de técnicas mais sensíveis e específicas como ferramenta complementar, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que é a técnica em estudo avaliada neste trabalho.

Do ponto de vista topográfico a Leishmaniose pode ser dividida em Leishmaniose tegumentar e Leishmaniose visceral e a seguir iremos abordar os aspectos clínicos, as características etiológicas, epidemiológicas, clínicas e diagnósticas destas formas.

1.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

1.1.1 HISTÓRICO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, existindo relatos e descrições encontrados na literatura desde o século I d.C. (8; 9). Nas Américas foram encontradas cerâmicas pré-colombianas (*huacos*), datadas de 400 a 900 anos d.C., feitas pelos índios do Peru, que apresentam mutilações de lábios e narizes, características da espúndia, hoje conhecida como leishmaniose cutânea-mucosa (10; 11).

A primeira referência de LTA no Brasil encontra-se no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, citado no livro de Tello intitulado “Antiguidad de la Syphilis en el Peru”, onde ele relata a viagem de Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros, que cursou da cidade de Tabatinga (AM) até o Peru, percorrendo as regiões do

vale amazônico. Este observara a existência de indivíduos com úlceras nos braços e pernas, relacionadas a picadas de insetos, tendo como consequência lesões destrutivas de boca e nariz. (12).

Admitem que o processo de dispersão para outras áreas do Brasil é recente, ocorrida principalmente através do ciclo econômico da borracha, entre 1880 e 1912, que atraiu milhares de nordestinos, que após o declínio da borracha retornaram às terras de origem ou foram atraídos para o ciclo do café na região sudeste do Brasil. Outros ciclos posteriores, que também implicaram mobilidades sociais, como a construção de rodovias (1960-70), a mineração do ouro (1970-80) e a exploração de madeiras (1980-90) teriam contribuído para a expansão (13).

O agente causador do botão do oriente do Velho Mundo foi descoberto em 1903 (14) e denominado *Leishmania tropica* em 1906 (15). Lesões cutâneas semelhantes encontradas na região neotropical só foram associadas a um parasito do gênero *Leishmania* em 1909, quando Lindenberg (16) e Carini e Paranhos (17), em estudos independentes, demonstraram "corpúsculos de *Leishman-Donovan*" (formas amastigotas) em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam na mata acometidos de "úlceras de Baurú" no Estado de São Paulo, idênticas à *Leishmania tropica* (14) da leishmaniose do Velho Mundo. Curiosamente, Lindenberg publicou sua descoberta em um jornal, *O Estado de São Paulo*, em 30 de março de 1909, e Carini e Paranhos divulgaram seus achados no dia seguinte no mesmo jornal.

Inicialmente, acreditava-se que o parasito causador deveria ser denominado *Leishmania tropica* (14; 15), porém Gaspar Vianna (18), clínico e parasitologista brasileiro, investigou formas amastigotas em lesões cutâneas de um paciente de Além Paraíba, Estado de Minas Gerais, Brasil, e concluiu que sua morfologia diferia das

formas amastigotas de *L. tropica*. Ele então denominou o parasito *Leishmania brasilienses*, posteriormente corrigido para *L. braziliensis* por Matta (19), em 1916.

Todos os casos de LTA eram atribuídos a *L. braziliensis* até a década de setenta no Brasil (11; 20). Com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies foram descritas, sendo registradas até o momento 7 espécies causadoras da LTA, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste. Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas, somente em animais (7).

No Brasil, merece destaque a descoberta, por Medina (21) em 1946 de um misterioso parasito que causava lesões na pele do porquinho-da-índia doméstico (*Cavia porcellus*); este parasito foi posteriormente denominado *Leishmania enriettii* Muniz & Medina, 1948 (22). Este achado foi um claro indicativo da presença de outras espécies dermatrópicas de *Leishmania*, além da *L. braziliensis*, e que poderiam infectar o ser humano no país (13).

Teorias moleculares sobre as leishmanias demonstram que o gênero tem cerca de 120 milhões de anos e que ocorreu ainda quando os continentes estavam unidos na pangéia (23; 24; 25). Atualmente o Brasil constitui o país com a mais alta prevalência de LTA em que o parasito *Leishmania braziliensis* é o agente etiológico principal, afetando quase trinta mil pessoas anualmente (26).

1.1.2 EPIDEMIOLOGIA

No Brasil, a LTA é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, pode ser considerada uma doença ocupacional. Apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras (7).

A LTA apresenta-se em fase de expansão geográfica. Nas últimas décadas, as análises de estudos epidemiológicos da LTA demonstram mudanças no comportamento epidemiológico da doença. Inicialmente considerada zoonose de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com florestas, a LTA começa a ocorrer em zonas rurais já praticamente desmatadas e em regiões periurbanas. Observa-se a coexistência de um duplo perfil epidemiológico, expresso pela manutenção de casos oriundos dos focos antigos ou de áreas próximas a eles, e pelo aparecimento de surtos epidêmicos associados a fatores decorrentes do surgimento de atividades econômicas, como garimpos, expansão de fronteiras agrícolas e extrativismo, em condições ambientais altamente favoráveis a transmissão da doença (7).

O Brasil é o país com mais casos de Leishmaniose cutânea na América do Sul. Até os anos 1950, a maioria dos casos se concentrava nos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Ceará e Pernambuco (27; 28).

No período de 1988 a 2007, a LTA apresentou média anual de 27.736 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 17,3 casos por 100.000 habitantes. Ao longo desse período, observou-se uma tendência no crescimento da

endemia, registrando os coeficientes mais elevados nos anos de 1994 e 1995, quando atingiram níveis de 22,83 e 22,94 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (7).

Ao analisar a evolução da LTA no Brasil, observa-se uma expansão geográfica, sendo que, no início da década de 80, foram registrados casos autóctones em 19 unidades federadas e, no ano de 2003, foi confirmada autoctonia em todas as unidades federadas do país. A região Norte vem contribuindo com o maior número de casos (cerca de 36,0% do total de casos registrados, no período) e com os coeficientes médios mais elevados (85,4 casos por 100.000 habitantes), seguida das regiões Nordeste (43,5 casos por 100.000 habitantes) e Centro-oeste (37,5 casos por 100.000 habitantes). A LTA ocorre em ambos os sexos e todas as faixas etárias, entretanto na média do país, predomina os maiores de 10 anos, representando 90% dos casos e o sexo masculino, 74% (7).

1.1.3 AGENTE ETIOLÓGICO E HOSPEDEIROS

As três principais espécies de LTA encontradas no Brasil são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis*.

A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* está distribuída pelas florestas primárias e secundária da Amazônia (Amazonas, Para, Rondonia, Tocantins e sudoeste do Maranhão), particularmente em áreas de igapó e de floresta tipo “várzea”. Sua presença amplia-se para o Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Centro-oeste (Goiás). A *Leishmania (Viannia) guyanensis* com aparente localização limitada ao norte da Bacia Amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e estende-se pelas Guianas. É encontrada principalmente em florestas de terra firme, em áreas que não se alagam no período de chuvas. A *Leishmania (Viannia) braziliensis* tem

ampla distribuição, do sul do Pará ao Nordeste, atingindo também o centro-sul do país e algumas áreas da Amazônia Oriental. Na Amazônia, a infecção é usualmente encontrada em áreas de terra firme (7).

Os hospedeiros invertebrados são pequenos insetos da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia*. Nesses insetos ocorre parte do ciclo biológico do parasito. Em todo o mundo existem cerca de 500 espécies de flebotomíneos conhecidos. Destes apenas 30 foram comprovadas como vetor da Leishmaniose (29). No Brasil há 16 espécies transmissoras, as principais espécies são *Lutzomyia whitmani*, *Lu wellcomei*, *Lu pessoai*, *Lu intermédia*, *Lu umbratidis* e *Lu flaviscutellata* (30). Algumas espécies de flebotomíneos possuem estreita relação com algumas espécies de *Leishmania*, bem como seus reservatórios, sendo, portanto, vetores específicos de algumas das formas clínicas das leishmanioses conforme a região do país (29). No **Quadro 1** está relacionada a forma clínica da LTA, espécies de *Leishmania* e as espécies de *Lutzomyia*.

Os hospedeiros vertebrados incluem grande variedade de mamíferos: roedores, edentados (tatu, tamanduá, preguiça), marsupiais (gambá), canídeos e primatas, incluindo o homem. A dispersão da doença nas mais variadas regiões do Brasil tem como fator a grande variedade de hospedeiros vertebrados que epidemiologicamente comportam-se como reservatórios (29).

São numerosos os registros de infecção em animais domésticos. Entretanto, não há evidências científicas que comprovem o papel destes animais como reservatórios das espécies de leishmanias, sendo considerados hospedeiros acidentais da doença. A LTA nesses animais pode apresentar-se como uma doença crônica com manifestações semelhantes às da doença humana (7).

A interação reservatório-parasito é considerada um sistema complexo, na medida em que é multifatorial, imprevisível e dinâmica, formando uma unidade biológica que pode estar em constante mudança, em função das alterações do meio ambiente (7).

Quadro 1. Relação da forma clínica da LTA, espécies de *Leishmania* e as espécies de *Lutzomyia*.

Leishmaniose	Espécie	Espécie de flebotomíneo
Cutânea e Mucosa	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>Lu. wellcomei</i>
		<i>Lu. complexus</i>
		<i>Lu. intermédia</i>
		<i>Lu. pessoai</i>
		<i>Lu. migonei</i>
		<i>Lu. amazonensis</i>
Cutânea e Mucosa	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>Lu. paraensis</i>
		<i>Lu. whitmani</i>
		<i>Lu. flaviscutellata</i>
Cutânea e Mucosa	<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>Lu. olmeca nociva</i>
		<i>Lu. reducta</i>
		<i>Lu. umbratilis</i>
Cutânea	<i>L. (V.) lainsoni</i>	<i>Lu. anduzei</i>
		<i>Lu. ubiquitalis</i>
		<i>Lu. whitmani</i>
Cutânea	<i>L. (V.) shawi</i>	<i>Lu. squamiventris</i>
		<i>Lu. naiffi</i>

1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL

1.2.1 HISTÓRICO

A leishmaniose visceral (LV) tornou-se conhecida com os achados do Dr. Willian Boog Leishman em 1901, médico escocês que servia o exército britânico na Índia, realizou a primeira descrição oficial do parasito em esfregaços de baço de um soldado britânico morto que apresentava hepatoesplenomegalia, reconhecendo a semelhança deste protozoário com as formas arredondadas do gênero *Trypanossoma*. Em 1903, Charles Donovan confirmou os achados de Leishman, observando baços de cadáveres ditos falecido de malária crônica. Porém, confundiu-o com o *Trypanossoma brucei*, causador da doença do sono, já descrito em 1894 por David Bruce (31). Mas foi Major Ross em 1903, que descobriu, com base nos achados anteriores, que os organismos evidenciados na preparação de Donovan pertenciam a um novo gênero e o nomeou de gênero *Leishmania*. Assim, o nome do agente etiológico da LV ficou sendo *Leishmania donovani* (32).

Como a LV na região do mediterrâneo atingia principalmente crianças, as evidências de diferenças entre o organismo causador nas diferentes regiões justificaram o estabelecimento da espécie *L. infantum* por Charles Nicolle em 1908. No mesmo ano, Nicolle estudou a relação dos cães com a doença, demonstrando que eles eram hospedeiros intermediários. Em 1911, foi possível elucidar seu mecanismo de transmissão, pela observação da infecção em *hamster* por meio de flebotomíneos. A data oficial dessa descoberta se refere ao ano de 1942, que foi quando se comprovou definitivamente a transmissão ao homem pelo *Phlebotomus argentipis* (33).

Existem suposições de que o primeiro caso humano autóctone da LV no Continente Americano registrado em 1911 tenha sido proveniente da região de Porto Esperança no município de Corumbá/MS, visto os registros de que um imigrante italiano que vivera em Santos/SP e após viajar para Mato Grosso do Sul apresentou os primeiros sinais da doença, e teve o diagnóstico no Paraguai (34).

No nordeste do Brasil, Henrique Penna em 1934, observou formas amastigotas do parasito em lâminas histológicas do fígado de pacientes durante pesquisa sobre a epidemiologia da febre amarela. A partir de então, foi criada uma comissão para estudar a LV no Brasil, tendo o Dr. Evandro Chagas, do Instituto de Manguinhos (Rio de Janeiro), sendo o primeiro a observar a doença no cão e no homem. Em 1937, Cunha e Chagas estabeleceram o agente etiológico no Brasil, pela denominação de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e como vetor provável da doença, o *Phlebotomus longipalpis* (35).

1.2.2 EPIDEMIOLOGIA

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a LV está entre as seis principais enfermidades infecto-parasitárias mais importantes do mundo dado a sua incidência, alta mortalidade em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, e emergência em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (3).

No Brasil, a LV apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV ocorreram na Região Nordeste. À medida que a doença se

expande para as outras regiões e atinge áreas urbanas e periurbanas, esta situação vem se modificando e, no período de 2000 a 2002, a Região Nordeste já representa uma redução para 77% dos casos do país (36).

As transformações no ambiente, provocadas pelo intenso processo migratório, por pressões econômicas ou sociais, o processo de urbanização crescente, o esvaziamento rural e as secas periódicas acarretam a expansão das áreas endêmicas e o aparecimento de novos focos. Este fenômeno leva a uma redução do espaço ecológico da doença, facilitando a ocorrência de epidemias. O ambiente característico e propício à ocorrência da LV é aquele de baixo nível socioeconômico, pobreza, promiscuidade, prevalente em grande medida no meio rural e na periferia das grandes cidades. Entretanto, estas características vêm se modificando, principalmente, nos estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste, onde a LV se encontra urbanizada (36).

Nos últimos anos, o número de mortes e a taxa de letalidade relacionada ao LV têm aumentado gradualmente, a partir de 117 mortes (3,4%) em 1994, para 262 (7,2%) em 2006, representando um aumento na taxa de mortalidade de quase 124%. Em 2007, 52,8 % dos casos confirmados eram de crianças afetadas LV menores de 10 anos de idade, sendo a maioria do sexo masculino (61,8%) e fatores de risco, como a desnutrição concomitante ou doenças infecciosas, parece muito importante no que diz respeito à futura evolução clínica (36).

1.2.3 AGENTE ETIOLÓGICO E HOSPEDEIROS

A leishmaniose visceral é uma doença sistêmica causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania* do complexo donovani. O complexo donovani engloba três espécies: *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) infantum*

chagasi. Das três espécies de *Leishmania* somente *L. (L.) infantum chagasi* está presente nas Américas. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (36).

Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção para a *L. (L.) infantum chagasi*, sendo considerado o reservatório doméstico do protozoário por possuírem alguns atributos peculiares, como por exemplo, é o animal mais suscetível à doença, apresenta prevalência elevada em áreas endêmicas, principalmente de assintomáticos, possuem um intenso parasitismo de pele, podem permanecer meses e até anos sem desenvolver a forma clínica da doença e são os animais domésticos preferidos dos humanos (37).

Os procedimentos integrados preconizados pelo Ministério da Saúde para o controle e prevenção da infecção pela leishmaniose visceral, tanto para humanos quanto para os cães são a eutanásia de cães sorologicamente positivos, avaliação e diminuição da população vetorial com utilização de inseticida no intra e peridomicílio e tratamento adequado para pessoas doentes (36).

A medida de controle do reservatório canino acarreta profundo impacto, considerando a relação homem-cão na sociedade e tendo em vista que esses animais têm se transformado em verdadeiros “membros” da família; o sacrifício de cães com sorologia anti-*Leishmania* positiva, na maioria dos casos de assintomáticos, torna-se cada vez mais inaceitável e de difícil execução pelas autoridades de saúde pública, aliado a essa situação, estudos enfocando a estratégia de eliminação canina tem oferecido resultados conflitantes (38; 39; 40).

A participação de outras espécies animais como galinhas, ovinos, equídeos, caprinos, suínos e felinos na epidemiologia da LV parece estar associada à capacidade

de atração dos vetores ao peridomicílio ou atuação daquelas espécies como reservatórios do parasito (41).

No Brasil, duas espécies de flebotomíneos até o momento estão relacionadas com a transmissão da LV: *Lutzomya longipalpis* e *Lutzomya cruzi*. A primeira espécie é considerada a principal espécie transmissora da *L. (L.) infantum chagasi* no Brasil. Nas regiões Norte e Nordeste, a *L. longipalpis* era encontrada originalmente nas matas participando do ciclo primário de transmissão da doença. Progressivamente houve adaptação desse inseto para o ambiente rural e sua adaptação a este ambiente foi somada à presença de animais silvestres e sinantrópicos. Recentemente, ao final da década de 80, verificou-se a adaptação deste vetor aos ambientes urbanos, em periferias de grandes centros, principalmente na Região Sudeste, podendo ser encontrados no peridomicílio, em galinheiros, chiqueiro, canil, paiol, entre outros ambientes e também no intradomicílio (36).

1.3 CICLO BIOLÓGICO DAS LEISHMANIOSES

O processo de interação vetor-parasito se inicia quando uma fêmea de flebotomíneo se alimenta em um hospedeiro vertebrado infectado. Elas realizam movimentos semelhantes a um tatear sobre a pele do hospedeiro, inspecionando previamente o tecido que será lesionado. Após a escolha do local adequado, a fêmea utiliza suas peças bucais, relativamente curtas e rígidas, para dilacerar os tecidos e vasos sanguíneos do hospedeiro, formando um pequeno poço de sangue no qual ela pode se alimentar (telmatofagia ou “pool-feeding”) (42).

O ciclo de vida da *Leishmania* se inicia no vetor quando uma fêmea de flebotomíneo ingere as formas amastigotas juntamente com o sangue do hospedeiro

vertebrado, rapidamente os amastigotas se posicionam no meio do bolo alimentar e se transformam em promastigotas procíclicas, os quais se multiplicam intensamente nas primeiras 48 horas. Período este, onde ocorre o processo digestivo e também a formação da matriz peritrófica, uma estrutura quitinosa ao redor do bolo alimentar. Após 2 a 5 dias, a matriz peritrófica se degenera e o bolo fecal começa a ser excretado passando pelo piloro e pelo íleo (43; 44)

Durante estes eventos, ocorre intensa multiplicação das formas procíclicas e o aparecimento das nectomonas, que preenchem o intestino abdominal anterior. Os parasitos ancoram-se via flagelo às microvilosidades do epitélio intestinal evitando a expulsão durante a liberação do bolo fecal. Em seguida, eles provavelmente os metacíclicos, se desprendem do epitélio, visto que eles não têm capacidade adesiva (Pimenta e cols. 1992), e migram para região anterior do intestino médio. Nesse período do desenvolvimento também são encontradas formas curtas e longas denominadas haptomonas e formas de pequeno corpo classificadas como paramastigotas. Após 5 dias ou mais, dependendo da espécie de vetor, uma massa de parasitos (promastigotas metacíclicas) pode ser observada na válvula do estomodeu (43; 45; 46; 47).

As formas metacíclicas (infectante) possuem um corpo celular pequeno, flagelo longo e não se dividem. São parasitos altamente móveis e livres que podem migrar ao longo do intestino anterior e alcançar a faringe, cibário e probócide, possibilitando assim a sua transmissão via picada em hospedeiro vertebrado. Experimentos utilizando a alimentação forçada de flebotomíneos infectados demonstraram que as formas metacíclicas são as únicas promastigotas ejetadas pelos vetores na pele dos vertebrados (48).

Quando as promastigotas metacíclica são introduzidas na pele, são internalizados através da endocitose mediada por receptores na superfície do

macrófago e ficam dentro de um vacúolo parasitóforo (fagolisossoma), que os separa do citoplasma celular, em seguida ocorrendo a rápida transformação em amastigotas, iniciando o processo de sucessivas multiplicações. A localização das amastigotas no interior dos macrófagos faz com que o controle da infecção seja dependente da resposta imune mediada por células. A principal célula efetora da eliminação das amastigotas é o próprio macrófago, após sua ativação por linfócitos T auxiliares (*helper*). Na fisiopatogenia da leishmaniose, os macrófagos são ao mesmo tempo células hospedeiras, apresentadoras de antígeno para o sistema imune e efetoras para a destruição do parasito. A localização intracelular das formas amastigotas no hospedeiro mamífero determina que anticorpos sejam ineficazes para o controle da infecção (29).

1.4 DIAGNÓSTICO PADRÃO OURO DAS LEISHMANIOSES

Vários métodos podem ser aplicados para o diagnóstico das leishmanioses, sendo fundamental associar as informações clínicas e epidemiológicas aos resultados de laboratório. O diagnóstico confirmatório de um processo infeccioso é realizado pelo encontro do parasito nos tecidos ou fluidos biológicos dos hospedeiros. Portanto, recomenda-se a confirmação do diagnóstico por método parasitológico antes do início do tratamento, especialmente naqueles casos com evolução clínica fora do habitual e/ou má resposta a tratamento anterior (7).

O exame direto consiste na visualização das formas amastigotas do parasito em material obtido das lesões ou tecidos afetados. Constitui o exame de primeira escolha, por ser mais rápido, de menor custo e de fácil execução, embora um examinador experiente seja necessário para o diagnóstico, visto que contaminantes dos

corantes, outros agentes infecciosos (principalmente fungos) e até mesmo plaquetas podem sugerir a presença de formas amastigotas. Com o material obtido é feito esfregaço ou impressão sobre lâmina de vidro e corado pela técnica de Giemsa, Leishman ou Wright e examinadas em microscópio óptico, procurando amastigotas que podem estar dentro ou fora dos macrófagos (49).

A sensibilidade de cada método de diagnóstico pode variar de acordo com a experiência de cada serviço, a qualidade do equipamento e dos insumos utilizados, o tempo de evolução das lesões, a forma clínica e as diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas (7).

A pesquisa direta nos casos de LV, a punção aspirativa esplênica é o método com maior sensibilidade (90-95%) para demonstração do parasito, seguida pelo aspirado de medula óssea, biópsia hepática e aspiração de linfonodos. Por ser procedimento mais seguro, recomenda-se a punção aspirativa da medula óssea (36). Nos casos de LTA a pesquisa direta é o primeiro procedimento por ser mais rápido, de menor custo e fácil execução. A probabilidade de encontro do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea. A infecção secundária contribui para diminuir a sensibilidade do método, dessa forma, deve ser tratada previamente. Para a pesquisa direta dos casos de LTA são utilizados os procedimentos: escarificação, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa (7).

A cultura é realizada através da inoculação do material com suspeita de conter as formas amastigotas do parasito, onde nesta ocorre a transformação em formas promastigotas. O meio bifásico NNN (Neal, Novy, Nicolle) é o mais comumente empregado. Após o quinto dia de incubação, alíquotas da fase líquida do meio de cultura são coletadas para exame a fresco, para a visualização de formas promastigotas. O exame é realizado em intervalos de sete dias por 30 dias (7). A

especificidade da cultura e do exame direto é de 100%, mas a sensibilidade é variável, sendo a distribuição do parasito não homogênea nas amostras. A sensibilidade mais alta (98%) é alcançada quando se utiliza aspirado do baço. As punções esplênicas e de medula óssea são consideradas procedimentos invasivos e exigem ambientes apropriados para a coleta (36).

1.5 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

O diagnóstico sorológico é realizado em todos os cães que compõem a área delimitada nos municípios com transmissão confirmada de LV, em municípios silenciosos receptivos vulneráveis e em municípios em investigação. Para a realização dos dois testes sorológicos são utilizados os “kits” padronizados pelos Laboratórios de Saúde Pública de Referência para Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Atualmente, vêm sendo utilizados os “kits” fornecidos pelo Ministério da Saúde do Brasil, produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunodiagnóstico Bio-Manguinhos.

Existem duas técnicas sorológicas recomendadas pelo Ministério da Saúde do Brasil para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais ou censitários, sendo a triagem realizada com o teste rápido *Dual Path Platform* (TR-DPP®) e o teste confirmatório, o ensaio imunoenzimático (ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (50).

O teste rápido *Dual Path Platform* (TR-DPP®), patenteado pela Chembio Diagnostic e desenvolvido pelo Instituto Biomanguinhos/Fiocruz (51), trata-se de um ensaio imunocromatográfico que emprega de um lado, a combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal (corante insolúvel), e de outro, antígenos

recombinantes k28 (fusão do rk39, rk26 e rk9), específicos do complexo *Leishmania donovani*, ligados a uma membrana. Se houver a presença de anticorpos anti-*Leishmania* na amostra testada, estes reagirão com os antígenos recombinantes, e em sequência se ligarão à combinação de proteína A e ouro coloidal, fornecendo o resultado positivo por meio da reação visualizada pela presença de uma linha de tonalidade rosa. A vantagem deste teste está em sua rapidez, simplicidade e de fácil execução, podendo ser desempenhado em campo (52).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) é considerado REAGENTE quando apresentar densidade óptica (DO) maior que o valor do ponto de corte (*cut off*) mais o valor percentual referente ao intervalo preconizado pelo “kit” utilizado, que atualmente é de 20%. Da mesma forma, a amostra será NÃO REAGENTE, quando a DO for menor que o valor do ponto de corte menos 20% do seu valor, conforme preconizado pelo “kit” utilizado (53).

Diversos autores concordam que as principais desvantagens dos testes sorológicos são a falha em detectar cães infectados antes da soroconversão, a não diferenciação entre animais infectados e resistentes, e a suscetibilidade às reações cruzadas com diversas outras enfermidades que acometem os cães com a tripanosomíase, babesiose, neoporose e erliquiose monocítica canina, correndo-se o risco de eutanásiar um cão falso-positivo (54; 55; 56; 57; 58; 59), implicando a necessidade de implantação de testes mais sensíveis no diagnóstico de LV canina.

1.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR E A IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

Apesar de diferentes métodos moleculares de diagnóstico para leishmaniose terem sido desenvolvidos, os métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase

(PCR) constituem as principais abordagens utilizadas por pesquisadores e profissionais de saúde (60). Diferentes variações da PCR estão disponíveis, mas as amplamente utilizadas são aquelas baseadas na técnica convencional ou com a adição da etapa das enzimas de restrição (PCR-RFLP [*restriction fragment length polymorphism analysis*]) (61; 62).

Outras metodologias mais sofisticadas como hibridização com fluorescência, sequenciamento ou PCR em tempo real também estão disponíveis, mas são técnicas mais caras e demoradas utilizadas mais para pesquisa do que para o diagnóstico (60).

O procedimento mais empregado para a identificação de parasitos é a análise de isoenzimas, método este considerado como ferramenta-ouro na identificação de espécies de isolados de *Leishmania* (63; 64). O polimorfismo entre os aminoácidos é responsável pela mudança na mobilidade da enzima produzindo diferentes fenótipos ou zimodemas (65). Esta técnica requer o isolamento e crescimento do parasito em meio de cultura, porém muitas cepas são de difícil isolamento e manutenção. O cultivo de promastigotas é raramente feito no diagnóstico de rotina por ser um método trabalhoso, demorado e que requer muita experiência (66; 67). Buscando contornar estas dificuldades e encontrar uma forma mais rápida, barata e segura de caracterizar os parasitos de amostras clínicas, algumas ferramentas moleculares vêm sendo utilizadas, em que podemos destacar como uma alternativa acessível e confiável a PCR.

Entre as aplicações práticas para as técnicas moleculares, podemos destacar seis principais, a primeira delas é a possibilidade de quantificação dos parasitos no tecido, o que é relevante para o monitoramento da progressão da doença. Protocolos de PCR em tempo real foram desenvolvidos para atender a essa necessidade (68). A segunda aplicação é para os casos onde é necessária a demonstração da viabilidade dos parasitos detectados. Nesses casos sugere-se a

quantificação de RNA do parasito através da PCR em tempo real com transcrição reversa ou QT-NASBA (*Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) (69).

A definição de características específicas do parasito, como virulência e resistência a drogas, constitui a terceira aplicação de técnicas moleculares, que ainda estão sendo exploradas para esse fim. A quarta aplicação pode ser chamada de rastreamento do parasito, mais relevante para pesquisas epidemiológicas do que para o diagnóstico, como pode ser ilustrado pelo trabalho de Cruz et al. (70).

A quinta aplicação é a detecção sensível e específica dos parasitos através da PCR, o que é necessário para o diagnóstico diferencial antes do início da terapia. O desempenho da PCR tem se mostrado melhor que a microscopia ou cultura dos parasitos, particularmente em amostras com baixa densidade de parasitos (a partir de pacientes com leishmaniose mucosa) (71) ou em amostras de fontes menos abundantes de parasitos, como o sangue periférico (70). O uso da PCR também se mostra relevante para o diagnóstico da leishmaniose em pacientes co-infectados com HIV (72; 70; 73). A detecção dos parasitos por PCR para confirmação da cura clínica é importante na leishmaniose visceral (74), mas deve ser explorada também na leishmaniose cutânea já que até 80% das feridas continuam positivas para PCR mesmo depois de oito anos após a cura clínica (75).

A sexta aplicação é a identificação da espécie do parasito que pode ser feita por uma série de técnicas baseadas na PCR. Essa identificação é útil para o gerenciamento clínico de pacientes devido à correlação entre algumas espécies de *Leishmania* e severidade da doença e sucesso do tratamento (76). Para isso técnicas como PCR (77), PCR-RFLP (71) e FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (78) foram desenvolvidas.

Na prática, essas seis aplicações moleculares serão implementadas dependendo de vários critérios incluindo a relevância clínica da questão correspondente a ser respondida, a disponibilidade de métodos alternativos, a habilidade técnica do pessoal e/ou a disponibilidade de equipamentos do laboratório. A PCR é um método que vem sendo amplamente utilizado para fins de pesquisa. Na rotina de diagnóstico, é pouco utilizado, porém acrescenta em sensibilidade quando utilizado com os métodos parasitológicos tradicionais.

2. OBJETIVOS

Geral:

Utilizar a técnica de PCR para o diagnóstico de Leishmaniose, tanto de amostras clínicas humanas, provenientes de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Unicamp e do Hospital Municipal Dr. Mário Gatti, como de amostras caninas procedentes das cidades de Campinas/SP e Teresina/PI.

Específicos:

- Avaliar a acurácia da PCR em amostras humanas e caninas.
- Avaliar as espécies de *Leishmania* causadoras de doença em humanos e cães.
- Diagnosticar reservatórios caninos potencialmente envolvidos na transmissão da leishmaniose nas cidades de Campinas/SP e Teresina/PI.
- Comparar o desempenho da PCR com as técnicas sorológicas utilizadas pelo Programa Nacional de Controle da LV canina, em duas regiões de diferentes perfis epidemiológicos de Leishmaniose.
- Utilizar a técnica de PCR para o diagnóstico das leishmanioses em amostras humanas e caninas.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, sendo aprovado pelo parecer de número 691/2011. Foram respeitadas as condições éticas pertinentes ao protocolo e seguidos rigorosamente os princípios enunciados na Declaração de Helsinque II de 20/08/1947 e da Resolução 196/96 da CONEP.

Este trabalho é de natureza laboratorial e foi realizado com material clínico encaminhado pelos médicos dos ambulatórios e enfermarias do HC da Unicamp e do Hospital Municipal Dr Mário Gatti ao Laboratório de Parasitologia do HC Unicamp para rotina diagnóstica. Não houve participação de grupos vulneráveis ou voluntários. As amostras de sangue de animais suspeitos foram selecionadas e colhidas a critério do Serviço de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Campinas e do Centro de Zoonoses de Teresina Piauí.

Como neste trabalho não existe contato direto com os pacientes, ou grupos vulneráveis e os exames laboratoriais foram solicitados por iniciativa do médico que os atende, foi solicitado e aprovada a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele não ser aplicável a este tipo de estudo. Trabalhamos apenas com amostras obtidas dos pacientes e a identificação do material no banco de dados foi realizada apenas pelas iniciais e pelo número do registro no HC. No processamento dos dados, e para futura publicação, o paciente é identificado apenas pelas iniciais e numeração, garantindo o anonimato de sua identidade. No presente estudo não houve utilização de animais de experimentação, mas apenas de animais investigados pelo

serviço de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Campinas/São Paulo e do Centro de Zoonoses de Teresina/Piauí.

3.2 LOCAL E DESENHO DO ESTUDO

Este trabalho foi realizado com amostras humanas da cidade de Campinas/SP, com suspeita de leishmaniose tegumentar e visceral, que foram direcionadas ao Laboratório de Parasitologia do HC da Unicamp, para diagnóstico diferencial.

As amostras caninas estudadas foram oriundas de duas regiões de distinto perfil epidemiológico: (i) cidade de Teresina/PI, localizada na região nordeste do Brasil, endêmica para a infecção em humana e canina por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* há décadas; (ii) e a cidade de Campinas/SP, localizada no sudeste do Brasil, sem registros de casos autóctones humanos, que foi incluída por apresentar nos últimos cinco anos uma região isolada, onde predominam uma população de classe média-alta, e que tem ocorrido aumento gradativo de casos de Leishmaniose canina.

O desenho de estudo deste trabalho se classifica como comparativo, quantitativo e transversal.

3.3 AMOSTRAS HUMANAS

Entre junho de 2012 e agosto de 2013, foram encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia do Hospital de Clínicas da Unicamp, 80 amostras humanas com suspeita de Leishmaniose (43 de medula óssea e 37 biópsias e/ou raspado de lesão

tegumentar), que foram analisadas pelas técnicas de pesquisa direta e cultura, consideradas padrão ouro.

Foram incluídas 40 amostras sabidamente negativas para leishmania e utilizadas como controle negativo, sendo 15 de sangue periférico. Entre estas, 9 positivas para *Plasmodium vivax*, 3 positivas para *Plasmodium falciparum* e 3 positivas para *Trypanosoma cruzi* e 25 amostras de pele, sendo 16 oriundas de reconstituição plástica de cicatriz, 4 biópsias de dermatites e 5 de carcinomas epiteliais.

3.3.1 CONDIÇÕES DE COLETA E TRANSPORTE

Para biópsias e raspados de lesão, as amostras foram colhidas em recipientes estéreis sem conservantes e para aspirado de medula óssea em tubo estéril sem anticoagulante.

3.3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA foi realizada com o *kit* comercial *Dneasy Blood and Tissue* (Qiagen®) segundo orientações do fabricante. Antes de iniciar a extração pelo *kit*, as amostras passaram por uma etapa de digestão diferenciada.

3.3.2.1 Amostras de biópsias e raspados de lesão tegumentar:

Pedaços pequenos das amostras recebidas foram recolhidos em tubos de 1,5mL e macerados o máximo possível com a ajuda de bisturis. Aos tecidos foram adicionados 20µL de proteinase K e 180µL de tampão ATL, ambos provenientes do *kit* comercial. Seguiu-se com agitação em vortex e incubação a 56°C overnight, ou até a máxima digestão, em banho úmido.

Após a digestão do tecido, adicionou-se 200µL de tampão AL (*kit* comercial) e agitou-se em vortex. Após realizou-se nova incubação a 70°C por 10

minutos em banho seco. Adicionou-se 200µL de etanol 96% e, após nova agitação em vortex, transferiu-se todo o volume para a coluna para o início da extração pelo *kit* comercial.

3.3.2.2. Amostras de aspirado de medula óssea

Após a coleta, 300µL do aspirado foram transferidos para um tubo tipo *Eppendorf* de 1,5mL. Ao volume total foram adicionadas 10 unidades de estreptoquinase CLS Behring® 750.000 UI para cada 200µL de amostra e o tubo incubado a 37°C por 18 horas após agitação manual leve por inversão, por 4 a 6 vezes.

Após essa incubação, seguiu-se com uma centrifugação a 3000rpm por 15 minutos à temperatura ambiente e o volume do sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi homogeneizado com uma pipeta e a ele foram adicionados 20µL de proteinase K e 200µL de tampão AL, ambos provenientes do *kit* comercial de extração. Agitou-se rapidamente os tubos em vortex e a seguir incubado a 56°C por 10 minutos em banho úmido. Seguiu-se com a adição de 200µL de etanol 96% e com nova agitação em vortex por 5 segundos. O volume do tubo foi totalmente transferido para a coluna para extração pelo *kit* comercial.

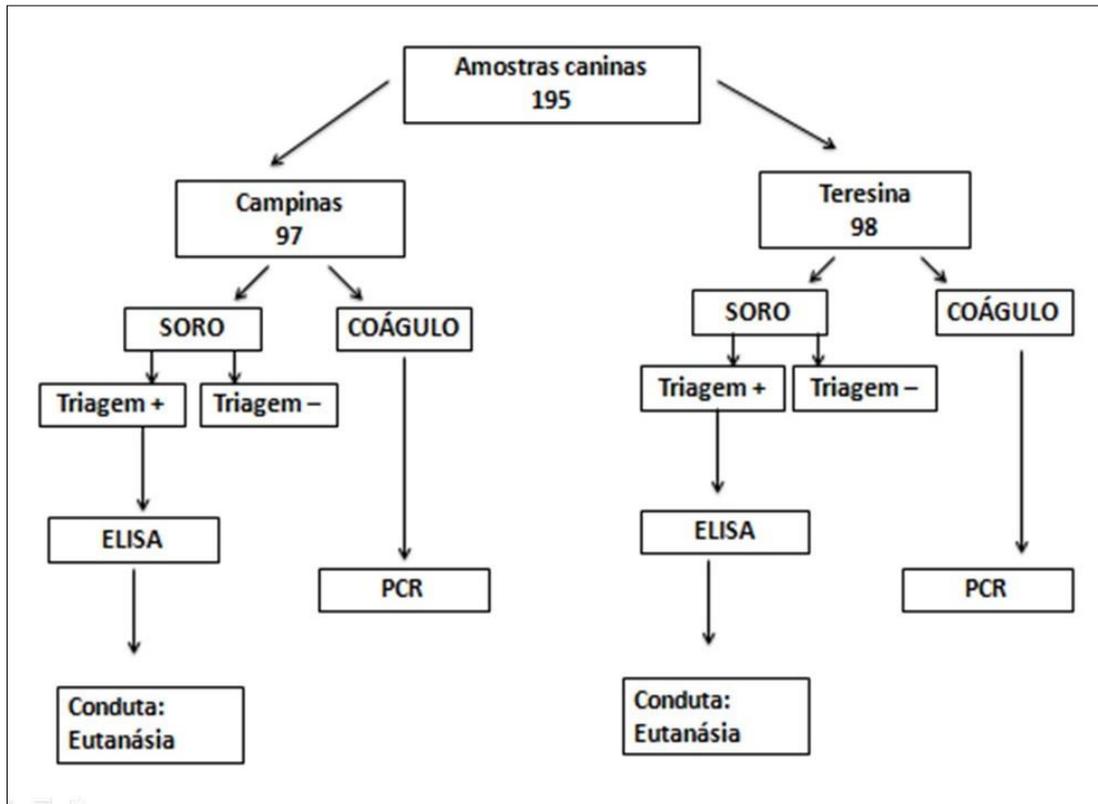
3.4 AMOSTRAS CANINAS

As amostras dos animais de Campinas foram colhidas entre setembro e outubro de 2012 e as de Teresina em janeiro de 2013. A obtenção das amostras foi realizada pelas equipes dos Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) dos respectivos municípios. A coleta do sangue periférico dos animais obedeceu ao calendário de investigação epidemiológica de cada cidade. Nestas coletas foram obtidas 195 amostras, sendo 97 de Campinas e 98 de Teresina, dos quais 34 de cada cidade eram

provenientes de cães suspeitos de Leishmaniose com sorologia de triagem positiva e os demais cães sem suspeita de Leishmaniose utilizados como controle negativo, foram assim considerados por apresentarem teste de triagem negativo e assintomáticos (Quadro 2).

As amostras foram obtidas por punção da veia cefálica e colocadas em tubos de polipropileno estéreis com gel separador.

Quadro 2: Fluxograma das amostras caninas



3.4.1 COLETA E TRANSPORTE DOS COÁGULOS

A coleta e o transporte dos coágulos foram realizados em tubos com gel separador. Logo após a realização das coletas em campo, os tubos foram centrifugados e a seguir ocorrendo a retirada do soro (utilizado pelos CCZs para exames sorológicos) e o envio do tubo com o gel separador contendo apenas o coágulo ao Laboratório de Parasitologia do Hospital de Clínicas da Unicamp.

3.4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Ao coágulo foram adicionados 10 unidades de estreptoquinase CLS Behring® 750.000UI para cada 200µL de amostra, seguida de incubação a 37°C por 18 horas. Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi homogeneizado com uma pipeta e a ele foram adicionados 20µL de proteinase K e 200µL de tampão AL, ambos provenientes do *kit* comercial de extração. Os tubos foram agitados em vortex por 5 segundos e incubados a 56°C por 10 minutos em banho úmido. Seguiu-se com a adição de 200µL de etanol 96% e com nova agitação por 5 segundos em vortex. O volume do tubo foi totalmente transferido para a coluna para extração pelo *kit* comercial.

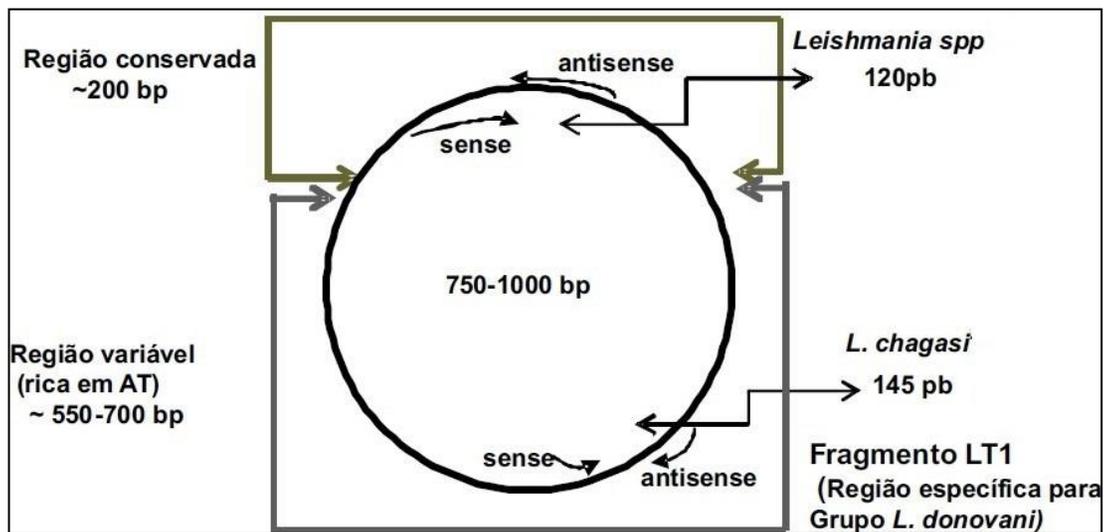
A extração do DNA foi realizada com o *kit* comercial *Dneasy Blood and Tissue* (Qiagen®) segundo orientações do fabricante.

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA GÊNERO E ESPÉCIES

A escolha dos iniciadores utilizados neste trabalho levou em consideração a alta sensibilidade e especificidade da reação, bem como a escolha de sequencias alvo com elevada número de cópias e conservadas nas diferentes espécies de *Leishmania*.

As *Leishmanias* apresentam uma organela composta de DNA (além do DNA nuclear), o kinetoplasto, situado na base do flagelo, é composto de uma rede de moléculas DNA circulares (kDNA), as quais podem ser divididas em dois grupos: os maxicírculos, composto por moléculas grandes, com cerca de 20-35kb, são homogêneas entre os diferentes grupos que compõe a ordem Kinetoplastida, e estão presentes em cerca de 20-50 cópias/kinetoplasto, e a outra região são os minicírculos, composto por moléculas menores, de 0,5-1,5kb, apresentam-se em grande quantidade (10.000 unidades/kinetoplasto) e com sequências heterogêneas entre os grupos. Dessa maneira, são utilizados para separar classes, gêneros ou espécies (79; 80).

Cada minicírculo de *Leishmania* é composto de uma molécula de DNA circular de 0,75 a 1kb de comprimento. Apresenta uma região conservada de aproximadamente 200pb contendo três blocos de sequências conservadas em todas as espécies de *Leishmania* (81). O restante da molécula, aproximadamente 550-700pb, apresenta sequências altamente variáveis, contendo um grande número de nucleotídeos adenina e timina. Portanto, nessa região, pode-se encontrar sequências específicas para os diferentes grupos de *Leishmania* (Figura 1) (79; 80).

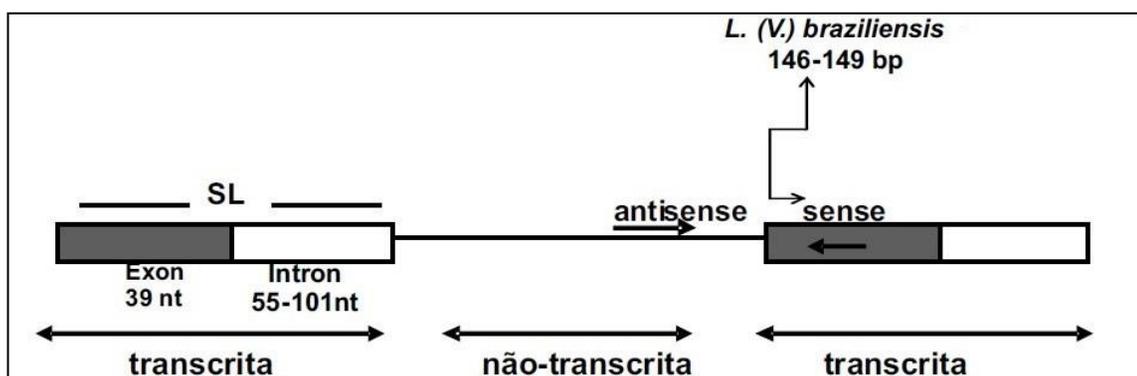


FONTE: www.ebi.ac.uk/parasites/kDNA/Source.html

Figura 1: Diagrama esquemático da organização de cada minicírculo de *Leishmania* e a localização dos iniciadores para gênero e para o grupo *L. donovani*.

Para a identificação do gênero *Leishmania* spp., foram utilizados os iniciadores Leish-150 (5'-GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA-3') e Leish-152 (5'-(C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3') (82; 83), esses iniciadores amplificam um fragmento de 120pb e derivam da região conservada dos minicírculos do gênero *Leishmania*. Para a espécie *L. (L.) infantum chagasi*, foram utilizados os iniciadores RV1 (5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3') e RV2 (5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3') (83; 84).

Para caracterizar as amostras infectadas por *L. braziliensis* escolhemos um par de iniciadores que tem como sequência alvo de um dos iniciadores é da região conservada SL (*spliced leader*- gene RNA mini-exon) comum em todas as espécies de *Leishmania*. O outro iniciador provém da região não transcrita, variável e específica para o complexo *L. braziliensis*, LU-5A (5'- TTTATTGGTATGCGAAACTTC-3') e LB-3C (5'-CGT(C/G)CCGAACCCCGTGTC-3') (Figura 2) (83; 85).



FONTE: www.ebi.ac.uk/parasites/kDNA/Source.html

Figura 2: Diagrama esquemático gene RNA mini-exon (ou spliced leader -SL) de *Leishmania* e localização dos iniciadores que identificam *L. (V.) braziliensis*.

Os iniciadores GAPDH-F (5'-AGGCTGAGAACGGGAAACTT-3') e GAPDH-R (5'-ATTAAGTTGGGGCAGGGACT-3') (86), gene codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, foram empregados como controles endógenos canino e os iniciadores $\beta 1$ (5'- ACCACCAACTTCATCCACGTTCCACC-3') e $\beta 2$ (5'- CTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGC-3') (87) foram empregados como controles endógenos humanos, estes consistem do gene para β -globina humana. Os controles endógenos certificam a presença de DNA após a extração e a ausência de inibidores de PCR.

Nas reações foram adicionados controle negativo (água ultra-pura), controle positivo para o gênero *Leishmania* spp., espécies *L. (L.) infantum chagasi* (DNA extraído de formas promastigotas, referencia da cepa: MHOM/BR/1972/LD) e *L. (V.) braziliensis* (DNA extraído de formas promastigotas, referencia da cepa: MHOM/BR/75/2903) e controle endógeno.

Para todas as reações foi utilizado o kit comercial *GoTaq Hot Start Green Master Mix (Promega®)* que reúne alguns dos reagentes necessários ($MgCl_2$, Tampão da enzima, dNTP e Taq DNA polimerase).

Para a amplificação do DNA, foi utilizado o termociclador *Mastercycler gradient (Eppendorf®)*. A ciclagem da reação de amplificação para determinar a presença de *L. (L.) infantum chagasi* iniciou com desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos com as seguintes condições: 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Após os 30 ciclos seguiu-se etapa final de extensão a 72°C por 5 minutos. A reação de amplificação originou fragmento de 145 pb.

As reações de amplificação do DNA para *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania* spp. seguiram as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 45 segundos, 58°C ou 55°C por 45 segundos e 72°C por

45 segundos, seguidos pela extensão final a 72°C por 5 minutos. As reações geraram, respectivamente, os fragmentos de 146-149 pb e 120 pb, para *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania* spp.

As reações para os controles endógenos seguiram as mesmas condições das quais foram usados como controle. As reações dos controles endógenos humano e canino originaram na amplificação fragmentos de 140pb e de 911pb, respectivamente.

O resultado da reação foi visualizado em gel de agarose a 2% em tampão TBE (Tris-Boro-EDTA) e corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Os fragmentos de DNA foram visualizados no transiluminador e os tamanhos dos fragmentos estimados por comparação com marcador de 100 bp.

Em todas as amostras de origem caninas e humanas, foi realizada as etapas de extração de DNA e PCR em duplicata.

O **Quadro 2** resume as sequências as temperaturas de anelamento e o tamanho dos amplicons dos iniciadores utilizados.

Quadro 3: Sequências, temperaturas de anelamento e tamanho do amplicon de cada um dos iniciadores utilizados nas reações de PCR.

Espécie	Iniciador	Sequência (5'-3')	TA	Amplicon
<i>L.L. infantum chagasi</i>	RV1	CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG	60°C	145 pb
	RV2	CCACCTGGCCTATTTTACACCA		
<i>L. braziliensis</i>	LU-5A	TTTATTGGTATGCGAAACTTC	58°C	146-149 pb
	LB-3C	CGTSCCGAACCCCGTGTC		
<i>Leishmania</i> ssp.	Leish 150	GGGKAGGGGCGTCTSCGAA	55°C	120 pb
	Leish 152	SSSWCTATWTTACACCAACCCC		
<i>Homo sapiens</i>	β1	ACCACCAACTTCATCCACGTTCCACC	A mesma utilizada na reação de C.E.	140 pb
	β2	CTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGC		
<i>Canis familiaris</i>	GAPDH- F	AGGCTGAGAACGGGAAACTT	A mesma utilizada na reação de C.E.	911 pb
	GAPDH- R	ATTAAGTTGGGGCAGGGACT		

TA = temperatura de anelamento, CE = controle endógeno.

3.6 DIAGNÓSTICO TRADICIONAL HUMANO

O Laboratório de Parasitologia do Hospital de Clínicas da Unicamp utiliza duas técnicas de diagnóstico de leishmaniose, a pesquisa direta, visualizadas as formas amastigotas e a cultura, visualizados as formas promastigotas, ambas tem como objetivo a visualização do parasito e, deste modo, as duas são consideradas pelo MSB como técnicas padrão ouro para o diagnóstico de leishmaniose visceral e tegumentar.

3.6.1. PESQUISA DIRETA EM AMOSTRAS DE LESÃO TEGUMENTAR

Para a pesquisa direta em amostras de lesão tegumentar foram utilizados os seguintes procedimentos: escarificação e biópsia com impressão por aposição. A escarificação foi realizada na borda da lesão ulcerada mais recente, sem secreção purulenta, ou na superfície da lesão não ulcerada, utilizando-se um estilete descartável, lâmina de bisturi estéril ou palito de madeira, com extremidade em bisel, previamente esterilizado. Com o material coletado, realizou-se um esfregaço em lâmina. A impressão por aposição foi realizada através da compressão do fragmento de tecido, obtido por biópsia, sobre uma lâmina microscópica, fixado em álcool metílico e corados pelo Giemsa

3.6.2. AMOSTRAS DE ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA

Em amostras de aspirado de medula óssea, uma gota do material foi colocada em uma das extremidades de lâmina previamente limpa, e o material foi firmemente dispersado na outra direção. Após secagem, os esfregaço foram fixados em álcool metílico e corados pelo Giemsa.

3.6.3. CULTURA DE LEISHMANIA

A cultura foi realizada com a inoculação do material (aspirado de medula e biópsias) no meio de crescimento específico para leishmanias. O meio utilizado para o crescimento de promastigotas foi o meio bifásico NNN (MacNeal, Novy e Nicolle). Nos casos de aspirados de medula óssea, a inoculação foi realizada no próprio local onde estava sendo colhida a amostra, sendo introduzida uma gota do material aspirado em tubo contendo o meio de crescimento. Pequenos fragmentos das amostras de lesão tegumentar foram introduzidas no meio de cultura, sendo apenas necessário colocar as amostras em contato com o meio líquido da cultura bifásica. As culturas foram mantidas entre 24-26°C, sendo observadas em intervalos de 4 dias, por um período total de 28 dias.

3.7 DIAGNÓSTICO TRADICIONAL CANINO

A realização dos testes sorológicos de triagem (Dual Path Platform - TR-DPP®, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil) e o confirmatório (ELISA – Ensaio Imunoenzimático, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil) utilizados pelo CCZ de ambas as cidades, obedeceu os protocolos pré-estabelecidos pelo Ministério da Saúde do Brasil (36), modificado pela Nota Técnica Conjunta 48/2011 (50).

3.8 ANÁLISE DOS DADOS

Amostras humanas

A PCR realizada para identificação de gênero e espécie de *Leishmania* foi comparada a pesquisa direta e a cultura. Foram avaliados a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos métodos com auxílio do programa computacional *SAS System for Windows (Statistical Analysis System)*, versão 9.2 (*SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA*). No estudo foram descritos os valores absolutos e percentuais para cada teste realizado.

Amostras caninas

A PCR realizada para identificação de gênero e espécie de *Leishmania* foi comparada ao teste de triagem e ao teste confirmatório (TR-DPP® imunocromatográfico e ELISA). Foram avaliados a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos métodos com auxílio do programa computacional *SAS System for Windows (Statistical Analysis System)*, versão 9.2 (*SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA*). No estudo foram descritos os valores absolutos e percentuais para cada teste realizado.

4. RESULTADOS

4.1 AMOSTRAS HUMANAS

Foram analisadas durante o período de estudo, 120 amostras humanas, sendo que 80 (66,67%) destas apresentavam suspeita clínica de leishmaniose (79 oriundas do Hospital de Clínicas da Unicamp e 1 do Hospital Municipal Dr. Mário Gatti) e 40 amostras (33,33%), sem suspeita de leishmaniose, foram utilizadas como controle negativo. Das 80 amostras suspeitas de leishmaniose, 43 foram obtidas de medula óssea e 37 de biópsias e/ou raspado de lesão tegumentar. Destas, 15 foram positivas na pesquisa direta e apenas 9 foram positivas na cultura e 20 apresentaram PCR positivo para gênero (tabela 1). Das 40 amostras utilizadas como controle, todas apresentaram resultados negativos para o PCR.

As 15 amostras que foram positivas na pesquisa direta apresentaram positividade na PCR, sendo 7 identificadas como *L. (L.) infantum chagasi*, 7 *L. (V.) braziliensis* e 1 positiva apenas para o gênero *Leishmania*, esta sendo procedente de amostra de punção de medula óssea.

Todas as 80 amostras com suspeita clínica de leishmaniose foram submetidas à cultura, mas apenas foi possível acompanhar o desenvolvimento de 64, pois 16 amostras tiveram que ser descartadas devido a presença de contaminantes. Das 64 amostras, apenas 9 foram positivas na cultura, que também foram positivas na pesquisa direta. Outras 6 amostras positivas na pesquisa direta foram negativas na cultura.

A tabela 2 apresenta a comparação dos resultados da PCR para o gênero *Leishmania* com a cultura e a pesquisa direta. Quando a PCR para o gênero *Leishmania* foi comparada com a cultura ($p=0,04550$), apresentou uma menor

especificidade (92,73%) e VPP (69,23%) do que quando comparada com a pesquisa direta ($p=0,0253$), onde apresentou uma especificidade 95,24% de e VPP de 75,00%.

A tabela 3 descreve os resultados da PCR quando realizada com os iniciadores para o gênero *Leishmania*, para as espécies *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) braziliensis* e o tipo de amostra que foram identificados.

Todas as 120 amostras foram testadas pelo método de PCR com os iniciadores para o gênero e para as 2 espécies de *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) braziliensis*. Nenhuma das amostras apresentou-se positiva simultaneamente para as 2 espécies. Todas as amostras controle foram negativas para gênero e espécies testadas. Entre as 5 amostras que apresentaram positividade apenas pela PCR, 1 foi positiva na PCR para gênero e para a espécie *L. (L.) infantum chagasi*, oriunda de punção de medula óssea, cuja consulta ao prontuário revelou o diagnóstico de leishmaniose visceral, notificado pelo NVE (Núcleo de Vigilância Epidemiológica) HC Unicamp. As 4 amostras restantes foram positivas apenas para o gênero, sendo que a consulta dos prontuários revelou mais um caso de leishmaniose tegumentar (amostra de tecido), também notificado pelo NVE HC Unicamp. Uma outra amostra de aspirado de medula óssea e 2 de pele, na análise dos prontuários destes pacientes o diagnóstico final foi respectivamente de choque séptico, colangite e hepatite C com HIV positivo.

Apenas uma amostra, oriunda de medula óssea, foi positiva na PCR para gênero e na pesquisa direta, mas negativo na PCR para as duas espécies testadas. Tratava-se de um paciente de 16 anos e do sexo feminino, em que na revisão do prontuário constatamos o diagnóstico de Leishmaniose Visceral.

Assim totalizamos 5 amostras de pacientes com PCR positivo para gênero e negativo para espécie, sendo destes 2 com diagnóstico final de Leishmaniose (tabela 3).

Tabela 1. Distribuição dos resultados da PCR, cultura e pesquisa direta de *Leishmania* em humanos.

Resultado da PCR		Pesquisa direta		Total
		Positivo	Negativo	
PCR	Positivo	15	5	20
	Negativo	0	60	60
Total		15	65	80*

Resultado da PCR		Cultura		Total
		Positivo	Negativo	
PCR	Positivo	9	4	13
	Negativo	0	51	51
Total		9	55	64**

PCR = reação em cadeia da polimerase para gênero *Leishmania*.

* 80 casos suspeitos de Leishmaniose submetidos a pesquisa direta e PCR.

** 64 casos suspeitos de Leishmaniose que foram submetidos a cultura e PCR.

Tabela 2. Comparação entre a PCR para o gênero *Leishmania* com pesquisa direta e cultura de amostras humanas.

Métodos	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	p-value
Cultura	100,00	92,73	69,23	100,00	0,0455
Pesquisa direta	100,00	95,24	75,00	100,00	0,0253

PCR = reação em cadeia da polimerase, VPP = valor preditivo positivo, VPN = valor preditivo negativo. Análise realizada pelo teste de McNemar.

Tabela 3. Descrição da PCR realizada, tipos de amostras humanas e resultados.

PCR (+) Tipos de amostras	Gênero <i>Leishmania</i>	Espécie <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	Espécie <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>	Negativa para as duas espécies
MO: 43	11	1	8	2
Pele: 37	9	6	0	3
Total: 80	20	7	8	5

PCR = reação em cadeia da polimerase, MO = medula óssea.

4.2 AMOSTRAS CANINAS

Durante o período de estudo, foram coletadas 195 amostras caninas, sendo 97 (49,74%) da cidade de Campinas e 98 (50,26%) de Teresina. Destas, 68/195 (34,87%) amostras foram positivas para teste de triagem, sendo 34 de cada cidade ($34/195 = 17,95\%$). As 127 amostras restantes (65,13%), sem suspeita de leishmaniose, foram utilizadas para controle negativo, sendo 63 provenientes de cães do canil do CCZ de Campinas e 64 cães do CCZ de Teresina. As amostras originárias do canil de Campinas e Teresina foram incluídas como controle negativo, por estarem clinicamente saudáveis e com teste de triagem e PCR negativos, neste grupo não foi realizado o teste de ELISA. Todos os cães de Teresina com suspeita de leishmaniose não apresentavam sinais clínicos da doença e em Campinas apenas um cão com suspeita apresentou sinais clínicos e com resultados de testes de triagem, confirmatório e PCR positivos.

A tabela 4 descreve a desempenho dos 3 testes diagnósticos aplicados nas duas cidades do estudo (triagem, confirmatório e PCR). Houve concordância entre os resultados da PCR e teste de triagem para as 30/34 (88,24 %) amostras provenientes de Campinas, enquanto que para as amostras de Teresina apenas 5/34 (14,71 %) foram concordantes. O teste confirmatório embora tenha apresentado significativo percentual de discordância em relação ao teste de triagem os resultados foram semelhantes nas duas cidades (58,82 versus 67,64%).

Na tabela 5 a PCR foi comparada com o teste de triagem revelando diferença de sensibilidade do PCR nas duas cidades de estudo ($p=0,0455$ para Campinas e $p<0.0001$ para Teresina), sendo que em Campinas foi observada maior sensibilidade da PCR (88,24%), quando comparada aos resultados de Teresina (14,71%).

Na tabela 6 a comparação da PCR com o teste confirmatório realizados nas duas cidades revelou resultados discordantes entre as técnicas de PCR e Elisa ($p=0.0027$ para Campinas e $p<0.0001$ para Teresina) para os valores de sensibilidade e especificidade. Em Campinas, para os 34 casos com teste de triagem positivo, ocorreram 30 casos de PCR positivos e 20 casos positivos para o teste confirmatório. Houve discordância entre ELISA e PCR em 9 casos com PCR positiva tanto para gênero como para espécie *L. (L.) infantum chagasi*. Um caso o teste confirmatório foi inconclusivo, este apresentou PCR e teste rápido positivos. Em Teresina, para os 34 casos com teste de triagem positivos, o teste confirmatório foi positivo para 23 amostras e o PCR em apenas 5 (tabela 7).

Todas as 195 amostras foram testadas pelo método de PCR com os iniciadores para as espécies de *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) braziliensis*. Nenhuma das amostras apresentou-se positiva quando testada com os iniciadores LU-5A e LB-3C (*L. (V.) braziliensis*) e todas as 35 amostras inicialmente positivas para o gênero *Leishmania* (30 de Campinas e 5 de Teresina), apresentaram-se positivas quando testadas com os iniciadores RV1 e RV2 (*L. (L.) infantum chagasi*).

Tabela 4. Descrição do desempenho dos 3 testes avaliados nas duas cidades estudadas.

Testes avaliados	Número de amostras	Campinas (casos positivos / total)	%	Teresina (casos positivos / total)	%
Triagem	68	34/34	100	34/34	100
Confirmatório	68	20/34	58,82	23/34	67,64
*PCR	68	30/34	88,24	5/34	14,71

Triagem= TR-DPP® imunocromatográfico, Confirmatório = enzyme-linked immunosorbent assay- ELISA, PCR = reação em cadeia da polimerase. *PCR para gênero *Leishmania* e para espécie *L.(L) infantum chagasi*.

Tabela 5. Valores de referência da PCR quando comparada ao teste de triagem (teste rápido TR-DPP® imunocromatográfico) em amostras das duas cidades.

Método de PCR	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	p-value
Campinas	88,24	100,00	100,00	94,03	0,0455
Teresina	14,71	100,00	100,00	68,82	<0,0001

PCR = reação em cadeia da polimerase para gênero *Leishmania* e para espécie *L.(L) infantum chagasi*, VPP = valor preditivo positivo, VPN = valor preditivo negativo. Análise realizada pelo teste de McNemar.

Tabela 6. Valores de referência da PCR quando comparada ao teste de confirmatório (ELISA) em amostras das duas cidades.

Método de PCR	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	p-value
Campinas	100,00	30,77	68,97	100,00	0,0027
Teresina	21,74	100,00	100,00	37,93	<0,0001

Elisa = enzyme-linked immunosorbent assay, PCR = reação em cadeia da polimerase para gênero *Leishmania* e para espécie *L.(L) infantum chagasi*, VPP = valor preditivo positivo, VPN = valor preditivo negativo. Análise realizada pelo teste de McNemar.

Tabela 7. Distribuição dos resultados dos testes e a localidade.

Localidade	Resultado da PCR	Teste de triagem		Total	
		Positivo	Negativo		
Campinas	PCR	Positivo	30	0	30
		Negativo	4	63	67
	Total		34	63	97
Teresina	PCR	Positivo	5	0	5
		Negativo	29	64	93
	Total		34	64	98
Total	PCR	Positivo	35	0	35
		Negativo	33	127	160
	Total		68	127	195

Localidade	Resultado da PCR	Teste confirmatório		Total	
		Positivo	Negativo		
Campinas	PCR	Positivo	20	9	29
		Negativo	0	4	4
	Total		20	13	33
Teresina	PCR	Positivo	5	0	5
		Negativo	18	11	29
	Total		23	11	34
Total	PCR	Positivo	25	9	33
		Negativo	18	15	29
	Total		43	24	67

Teste de triagem= teste rápido TR-DPP® imunocromatográfico, Teste confirmatório= (Elisa) enzyme-linked immunosorbent assay, PCR = reação em cadeia da polimerase para gênero *Leishmania* e para espécie *L.(L) infantum chagasi*.

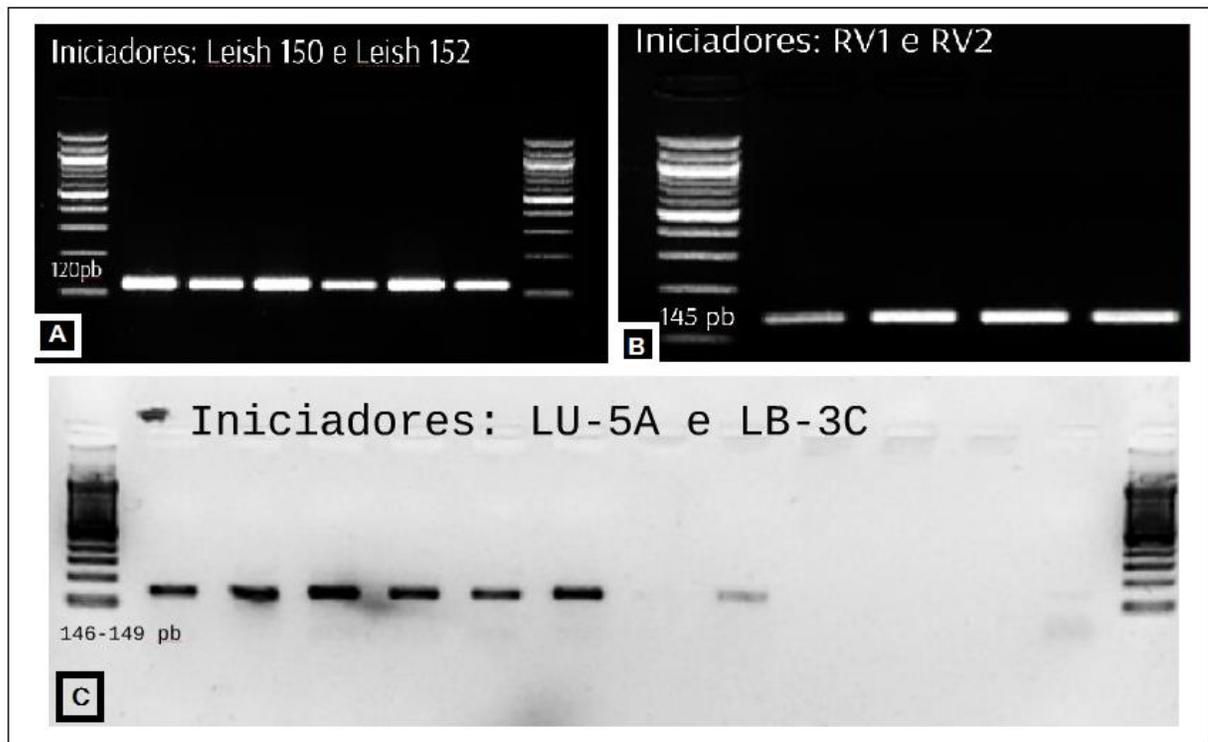


Figura 3: Fotos dos géis de agarose: A: Utilizados os iniciadores para o gênero *Leishmania*. B: Utilizados os iniciadores para a espécie *L. (L.) infantum chagasi*. C: Utilizados os iniciadores para a espécie *L. (V.) braziliensis*.

5. DISCUSSÃO

Diferentes métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares são utilizadas na investigação das leishmanioses para fins diagnósticos e monitoramento, principalmente quando relacionado aos casos humanos e caninos (55; 60; 83; 88; 89; 90; 91). O uso destes métodos de diagnóstico, ainda assim a interpretação dos resultados e a conduta é um campo aberto a discussões, principalmente nas áreas onde existem várias espécies deste parasito e por consequência, variadas formas de manifestações clínicas.

O diagnóstico tradicional é considerado padrão ouro, que tem como princípio a visualização do parasito, seja por pesquisa direta ou pelo crescimento em meios de cultura, apresenta limitações consideráveis. Entre elas destacam-se o número muito variável de parasitos presentes nas diferentes amostras clínicas, a experiência técnica necessária para o sucesso da identificação microscópica de amastigotas em preparações coradas, a frequente contaminação dos meios de crescimento e a eficácia das diferentes formulações destes meios de cultura. Outra importante limitação destes recursos é não permitir a identificação em nível de espécie, cuja precisa distinção tem benefícios clínicos e epidemiológicos, permitindo uma melhor orientação do tratamento médico e monitoramento, uma vez que o progresso clínico e a sensibilidade do parasito às drogas podem variar, dependendo das espécies envolvidas (92).

A PCR é pouco utilizada na vigilância epidemiológica e no diagnóstico por ser considerada de alto custo, demandar equipamentos específicos, pela falta de padronização da técnica e equipe treinada. Contudo, nas pesquisas têm sido bastante utilizada e tem mostrado benefícios, pela rapidez, elevada sensibilidade e especificidade e pela utilização de diferentes materiais biológicos (60; 85; 90; 93; 94).

A Leishmaniose tegumentar pode apresentar um amplo espectro clínico, podendo seguir apenas como uma ulceração única até uma forma disseminada, podendo ser confundida com outras doenças da pele, tais como infecções cutâneas causadas por estafilococos, estreptococos, úlcera por micobactérias e infecções fúngicas, sendo, portanto, necessário ao nível dos cuidados de saúde primários, a utilização de um método de diagnóstico sensível e espécie-específica (95).

As técnicas moleculares têm várias vantagens em comparação com os tradicionais, tais como a alta sensibilidade traduzida pela capacidade de detectar parasitos presentes em números muito baixos e a versatilidade pela possibilidade de ser realizada com uma vasta gama de amostras clínicas (96; 97; 98; 99). O gene de RNA SL (Leader Spliced), está presente no genoma nuclear, tal como uma matriz de conjunto de aproximadamente 200 cópias, sendo um bom alvo para identificação das espécies envolvidas nos casos suspeitos de LTA, devido ao elevado número de cópias no genoma e a presença de regiões conservadas transcritas e variáveis não transcritas que diferem entre os complexos de *Leishmania* em sequência e tamanho (80).

O par de primer usado neste estudo (LU-5A/LB-3C) foi desenvolvido para amplificar uma sequência de genes de 146-149 pb do complexo *L. braziliensis*, que inclui as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana*. O iniciador sense é oriundo da região conservada para o gênero *Leishmania* spp. e o anti-sense é específico para a região variável de *L. braziliensis* complexo (85).

Estudos anteriores demonstraram a alta sensibilidade e especificidade deste par de primers testados em raspados cutâneos a partir de lesões ulceradas da leishmaniose tegumentar confirmadas de pacientes na América do Sul e Central (85) e em cães no Brasil (83). Em nosso trabalho, não houve nenhuma amplificação na PCR,

quando testados os iniciadores LU-5A/LB-3C, a partir de cepas de referência de *L. (L.) infantum chagasi* e de amostras contendo *Plasmodium vivax* e *P. falciparum*, bem como não foi observado nenhum produto da PCR em amostras que continham formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, outro cinetoplastida filogeneticamente próximo a *Leishmania* spp..

Nas nossas amostras humanas, a PCR quando utilizados os iniciadores Leish-150/Leish-152 e LU-5A/LB-3C, específicos para o gênero *Leishmania* e para o Complexo *L. braziliensis*, nas 15 amostras que foram positivas tanto na pesquisa direta como na PCR para gênero, identificou 7 amostras como *L. braziliensis*. Destas, 6 eram oriundas de amostras de pele e 1 de medula óssea, e apenas esta última foi procedente de um paciente HIV positivo.

O registro do primeiro caso de Leishmaniose visceral ocasionado pela espécie *L. (V.) braziliensis* em um paciente HIV positivo, foi descrito em 1993 por Hernández D et al., usando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que permitiu a identificação do organismo causador do quadro visceral. Em ambos os casos foi detectada uma profunda depressão de células CD4, que foi provavelmente responsável pelo envolvimento visceral por *L. (V.) braziliensis*. Esta apresentação clínica atípica desta espécie, aliado ao aumento do número de casos de co-infecção leishmania-HIV (49), reforçam a necessidade de um recurso diagnóstico para a identificação e caracterização específica do parasito para fins de tratamento. Especialmente em pacientes com depressão imunidade mediada por células, o diagnóstico não deve ser limitado as manifestações clínicas e a visualização direta do parasito (100).

A PCR para gênero *Leishmania* e espécie *L. (L.) infantum chagasi*, em amostras humanas, identificou sete, das 15 amostras positivas na pesquisa direta, todas procedentes de amostras de punção de medula óssea. Os primers utilizados para

a identificação da espécie *L. (L.) infantum chagasi* (RV1/RV2), são sequências oriundas dos minicírculos de kDNA, considerados bons alvos, pois apresentam número muito elevado de cópia (10.000 por célula) e por conter sequências conservadas e variáveis, dessa maneira, são importantes para identificação de classes, gêneros ou espécies. Minicírculos são pequenas moléculas circulares de DNA (800pb) encontrados no cinetoplásto que contêm uma região conservada de 120-150pb, que podem ser utilizados com auxílio da amplificação por PCR (101).

Os iniciadores escolhidos para a identificação da espécie *L. (L.) infantum chagasi* (RV1/RV2), amplificam uma sequência da região específica do complexo *L. donovani*, além de apresentarem uma alta sensibilidade e especificidade em amostras humanas e caninas (83; 84; 102). Estes iniciadores também foram específicos quando cepas de referência de *L. (L.) infantum chagasi* foram testadas. Nenhum produto da PCR foi obtido a partir cepas de referência de *L. braziliensis*, que são predominantes em diversas regiões do Brasil e também não foi observado nenhum produto da PCR quando testado em amostras contendo *T. cruzi*, *P. vivax* e *P. falciparum*.

O par de iniciadores Leish 150/Leish 152, também oriundos dos minicírculos de kDNA, amplificam uma sequência de 150pb da região conservada presente em todas as espécies de *Leishmania* spp., proporcionando um alvo molecular ideal para detecção do gênero, pois estão presentes em milhares de cópias por célula (101).

Neste trabalho, apenas 1 amostra de punção de medula óssea, confirmada pela pesquisa direta para *Leishmania* spp., não foi possível identificar a espécie envolvida, havendo a detecção da amplificação por PCR apenas quando testados os iniciadores para o gênero (Leish 150/Leish 152). O que podemos conjecturar é a

possibilidade de ocorrência de outra espécie, não testada neste trabalho, envolvida na infecção com o comprometimento visceral.

Além dos 15 casos positivos na PCR e confirmados na pesquisa direta, este método de diagnóstico molecular possibilitou a identificação de 5 outros casos suspeitos de leishmaniose, mas que apresentaram pesquisa direta e cultura negativas, responsáveis pela redução da especificidade e do VPP da pesquisa direta (95,24%; 75%) e da cultura (92,73%; 69,23%) quando comparada a PCR.

Entre os casos suspeitos e não confirmados pelo diagnóstico tradicional, 3 eram oriundos de punções de medula óssea e 2 de pele; um dos casos foi notificado como leishmaniose visceral, tendo como critério de confirmação a clínica do paciente e testes sorológicos (IFI); a PCR deste caso, realizada com amostra de medula óssea, apresentou-se positiva para o gênero e para a espécie *L. (L.) infantum chagasi*. Outra amostra, neste caso de pele, foi notificada como leishmaniose tegumentar, tendo como critério de confirmação os achados clínicos e epidemiológicos do paciente, com 88 anos de idade, que relatou episódios de LTA há 50 anos, tendo neste período realizado tratamentos, mas sempre com recidivas. Estes 2 casos, na verdade devem ser considerados positivos, apesar dos testes tradicionais de diagnóstico apresentarem resultados negativos, pois apresentavam evidências clínicas e epidemiológicas convincentes.

As outras 3 amostras, não confirmadas pela pesquisa direta, apresentaram positividade apenas na PCR para gênero, 2 oriundas de amostras de punção de medula óssea e 1 de pele. Na revisão destes prontuários, estes casos foram registrados respectivamente com diagnóstico de choque séptico, colangite e hepatite C associada com HIV positivo. Pode-se considerar pequena a quantidade de casos a serem

considerados como falsos positivos (apenas 3) e desta forma não comprometem significativamente a especificidade desta valiosa ferramenta para fins de diagnóstico.

Das 15 amostras que foram positivas na pesquisa direta, em 9 houve crescimento em meio de cultura. Destas 9, 4 apresentaram positividade na PCR para gênero e para a espécie *L. (L.) infantum chagasi*, todas oriundas de medula óssea, e 5 apresentaram positividade na PCR para gênero e para a espécie *L. (V.) braziliensis*, sendo 4 de pele e 1 de medula óssea. As 6 amostras restantes, positivas apenas na pesquisa direta, 2 procedentes de pele tiveram crescimento interrompido devido o crescimento de contaminantes, as outras 4 amostras, oriundas de punção de medula óssea, apresentaram-se negativas para a cultura.

A contaminação dos meios de cultura foi um fator importante que limitou o acompanhamento de 16 das 80 amostras com suspeita de leishmaniose (7 medula óssea e 9 pele). De modo geral, a utilização da cultura para diagnóstico da leishmaniose tem por principal objetivo melhorar a sensibilidade da detecção do parasito, almejando um diagnóstico preciso da infecção, como um teste suplementar, utilizado quando outros métodos, menos específicos, têm falhado (103). Para se obter um melhor resultado das culturas de leishmania, são necessários cuidados adicionais desde os procedimentos antissépticos utilizados na coleta do material, o meio e o tempo de transporte utilizado para o envio do material ao laboratório, a padronização das fórmulas dos meios, monitoramento constante das temperaturas de incubação das culturas, bem como considerar as particularidades existentes dependendo da espécie de leishmania envolvida.

A PCR realizada em amostras caninas foi avaliada em duas cidades com cenários epidemiológicos bem diferentes. A cidade de Teresina/PI foi considerada por apresentar disseminação da leishmaniose visceral em humanos e cães, desde a

década de 1980, associada a condições socio-econômicas e de saneamento básico precárias e modificações ambientais, moduladas pelo intenso processo de urbanização, o que favoreceu a adaptação do vetor ao ambiente urbano (104). A cidade de Campinas/SP, que há cinco anos vem sendo monitorada pelo aparecimento de casos de LVC (Leishmaniose Visceral Canina) em uma área restrita da cidade, onde não há registros de casos humanos autóctones (105).

Utilizamos a PCR para diagnóstico da LVC usando sangue periférico, por esta apresentar vantagens consideráveis: (i) presença de parasitos circulantes são conhecidos por ocorrer em cães, (ii) este tipo de amostragem é simples e não invasivo em comparação com o aspirado ou biópsia do linfonodo ou aspiração da medula óssea, (iii) sua alta sensibilidade em comparação com os métodos convencionais (sorológicos e parasitológicos) permite a detecção de cães assintomáticos (e às vezes soronegativos) (90; 93; 106; 107), (iv) um alto valor preditivo positivo (107) e (v) permite melhor acompanhamento longitudinal e monitoramento da infecção (102). No entanto, tem como limitação não poder ser utilizada como recurso único para confirmação de doença, pois um resultado positivo pode representar apenas infecção (parasitemia) e não doença, dependendo da resposta imune e do tempo de infecção. Já uma forte suspeita clínica, mesmo com sorologia negativa, a PCR positiva confirma o diagnóstico de Leishmaniose (108).

A sensibilidade foi a medida com maior discordância quando comparamos a PCR e o teste de triagem (teste rápido TR-DPP® imunocromatográfico) e o confirmatório (ELISA) em ambas as cidades, onde os resultados de Teresina apresentou sensibilidade inferior (PCR/Triagem=14,71%; PCR/ELISA=21,74%), diferente dos resultados obtidos em Campinas que apresentou elevada sensibilidade (PCR/Triagem=88,24%; PCR/ELISA=100,00%). Resultados semelhantes foram

encontrados por Quinnell et al. (109), que compararam a detecção da *Leishmania* por PCR, sorologia e a resposta imune celular em cães, relatando variação da sensibilidade da PCR durante o curso da infecção, sendo mais elevada (78-88%) de 0 a 135 dias pós-infecção, reduzindo para aproximada a 50% após 300 dias. A diferença da sensibilidade quando utilizamos uma técnica molecular em duas regiões de diferentes cenários epidemiológicos, pode estar relacionada a um provável perfil agudo/sub-agudo da infecção, presente na população canina de Campinas, e predominantemente crônico em Teresina.

Na cidade de Campinas, houve uma maior concordância entre o teste de triagem e a PCR (34/30) e uma maior discordância entre o teste confirmatório quando comparada com a PCR (20/30). Outro resultado importante é a aparente baixa especificidade da PCR obtida na cidade de Campinas (30,77%), justificada pela presença de nove amostras com PCR positiva e teste confirmatório (ELISA) negativo. No entanto estes 9 casos eram positivos pelo teste de triagem. Esses resultados nos levam a refletir sobre a acurácia do esquema de diagnóstico da LVC implantada no Brasil, especialmente quando considerada uma população de infecção mais recente, caso da amostra de Campinas. Nesta população o teste de triagem se mostrou mais sensível e específico que o teste confirmatório, tendo como referência a detecção do DNA do parasito pela PCR. Assim, explica-se o aparecimento de um significativo número de amostras possivelmente falso negativas pelo ELISA e a alta sensibilidade da PCR, semelhantes aos achados anteriores de Fallah et al. (110), que mostraram a utilização dessa técnica (kDNA-PCR) para detectar DNA do parasito em amostras de sangue periférico com ELISA soronegativo de cães infectados.

Para as amostras de Campinas o VPP da PCR foi de 100% quando comparada com o teste de triagem, sugerindo que a PCR possa ser uma ferramenta

eficaz na detecção de infecção ativa e recente, e o VPN da PCR foi de 100% quando comparado com o teste confirmatório. Em Teresina o VPP da PCR foi de 100% quando comparado com os dois métodos, mas o VPN foi baixo, 68,9% em relação ao teste triagem e 37% para o confirmatório, desta maneira a PCR não se mostrou tão útil nesta casuística, pois o percentual de amostras positivas foi muito baixo.

A acurácia das técnicas sorológicas utilizadas pelo Programa de Vigilância e Controle da LVC é questionável (111; 112), principalmente quando é o método de indicação para a eutanásia canina (36), pois é desprezada a falta de evidência científica que respalde a relação existente entre a eliminação de cães soropositivos e a redução da infecção em humanos (111; 112; 113). Essa reflexão é ainda mais necessária quando visualizamos a situação epidemiológica encontrada nos cenários escolhidos para o desenvolvimento deste trabalho, de um lado temos Teresina/PI, que há décadas persiste com uma epidemia de Leishmaniose humana, aliado com uma alta prevalência de cães sorologicamente positivos, mas, de acordo com nossos resultados, pequeno número de animais demonstram parasitos em circulação (5), o que torna questionável seu real valor de reservatório. Por outro lado, encontramos a cidade de Campinas/SP, onde a infecção se alastra no meio canino, com parasitemia amplamente detectada na circulação periférica, mas cursa com ausência de casos clínicos humanos.

Outro ponto relevante a ser considerado como uma limitação do trabalho com amostras caninas foi a não comparação da PCR e das técnicas sorológicas com o padrão ouro, considerada pelo Ministério da Saúde do Brasil (36), a visualização do parasito. Ainda assim, os resultados obtidos com a comparação dos métodos de diferentes princípios aqui apresentados, nos faz refletir sobre a verdadeira acurácia do esquema de diagnóstico utilizado pelo Programa de Controle e Vigilância da Leishmaniose Visceral Canina no Brasil.

Este panorama nos permite evidenciar a complexidade do ciclo da Leishmaniose, onde podemos encontrar diferentes padrões desta infecção, possíveis preferências do vetor por outras fontes de repasto ou até mesmo diversidade da virulência do parasito para o hospedeiro canino e humano.

6. CONCLUSÃO

Para o diagnóstico de LV e LT em humanos a PCR mostrou excelente concordância com os testes padrão ouro, com elevada sensibilidade e especificidade.

Foi possível comprovar a ausência de reações cruzadas dos primers utilizados com outros parasitos filogeneticamente próximos.

Embora a cultura seja considerada um método padrão-ouro, podemos destacar a dificuldade em manter o cultivo por consequência de frequente contaminação.

A PCR apresenta-se como uma ferramenta de considerável valor para a identificação das espécies envolvidas nas infecções em cães e humanos.

Através desse método (PCR) foi possível identificar um caso de Leishmaniose Visceral, em humano, ocasionada pela espécie *Leishmania (V.) braziliensis*.

No diagnóstico da leishmaniose visceral canina em cidades com perfil epidemiológico como Campinas onde o surto parece ser mais recente, o desempenho da PCR mostra-se muito útil na detecção de cães infectados. Nesta população o teste de triagem se mostrou mais sensível e específico que o teste confirmatório, tendo como referência a detecção do DNA do parasito pela PCR.

No caso de Teresina, com provável padrão de doença canina endêmica de longa duração, a PCR não se mostrou útil para diagnóstico, exceto para detecção de cães com provável parasitemia ativa ou antigenemia.

A PCR pode permitir uma melhor avaliação do risco, num determinado momento, de cada cão estar servindo como reservatório do parasito.

Testes que apenas avaliam o estado imunológico canino, como os testes utilizados pela MSB, não comprovam a ocorrência de parasitos em circulação, não sendo suficiente como critério para indicação de eutanásia.

REFERÊNCIAS

1. Ashford, RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*. 2000;30(12-13):1269-1281.
2. Marzochi MCA. Leishmaniose tegumentar americana. In Cimerman B, editor. *Parasitologia humana e seus fundamentos gerais*. São Paulo: Atheneu; 1999. p. 39-64.
3. WHO - World Health Organization; 2010. Leishmaniasis: background information. [Online]. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acessado em jan, 2012.
4. Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinical in dermatology*. 1996;14(5):417-423.
5. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001;95(3):239-243.
6. MSB - Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral, Brasília; 2003.1 ed., 120p.*
7. MSB – Ministério da Saúde do Brasil; 2007. “Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana”. [Online]. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/svs>>. Acessado em abril, 2011.
8. Lainson R. Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina*. 1997;11(1):29-40.
9. Camargo LMA, Barcinski MA. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Ciência e Cultura*. 2003,55(1):34-37.
10. Lainson R, Shaw JJ. New world Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. In: Topley and Wilson, editors. *Microbiology and Microbial Infections*. London: Feg Cox; 1988.p.91-124.
11. Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2010;1(2):13-32.
12. Paraguassu-Chaves CA. *Geografia Médica ou da Saúde (Espaço e doença na Amazônia Ocidental)*. Rondônia: Edufro; 2001. p. 61-79.

13. Alfredo J, Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MCA, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KBF. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. *História, ciências, saúde – Manguinhos*. 2003;10(2):853-82.
14. Wright JH. Protozoa in a case of tropical ulcer ("Delhi sore"). *J Med Res*. 1903;10(3):472-482.
15. Lühe M. Die im Blute schmarotzenden Protozoen und ihre nächsten Verwandten. In: Mense C, Barth IA, editors. *Hanbuch der Tropenkrankheiten*. 1906. p.203.
16. Lindenberg A. L'ulcère de Bauru ou le bouton d'orient au Brésil. *Bull Soc Path Exot*. 1909;2:252-254.
17. Carini A, Paranhos U. Identification de l'ulcera de Baurú avec le bouton d'Orient. *Bull Soc Path Exot*. 1909;2:225-226.
18. Vianna G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (Nota Preliminar). *Bras Med*. 1911; 25:411.
19. Matta AA. Sur les leishmanioses tégumentaires. Classification générale des leishmanioses. In Masson, editor. *Bull Soc Path Exot*. 1916.p.494-503.
20. Basano SA, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Bras. Epidemiol*. 2004;7(3):328-337.
21. Medina HSG. Estudos sobre leishmaniose. I. Primeiros casos de leishmaniose espontânea observados em cobaias. *Arq Biol Tec*. 2001;1:13-55.
22. Machado MI, Milder RV, Pacheco RS, Silva M, Braga RR, Lainson R. Naturally acquired infections with *Leishmania enriettii* Muniz and Medina 1948 in guinea-pigs from São Paulo, Brazil. *Parasitology*. 1994;109:135-138.
23. Thomas-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1993;68(2):107-108.
24. Noyes HA. Implications of a neotropical origin of the genus *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1998;93(5):657-661.
25. Momen H, Cupolillo E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000;95(4):583-588.

26. Marzochi MCA. Epidemiologia e possibilidade de controle das leishmanioses no Brasil. Perspectivas tecnológicas em saúde: os desafios da leishmaniose e da febre amarela. Fiocruz, Bio-Manguinhos. 2001;1:24-26.
27. Passos VM, Falcão AL, Marzochi MC, Gontijo CM, Dias ES, Barbosa-Santos EG, Guerra HL, Katz N. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1993;88(1):103-110.
28. Brandão-Filho SP, Campbell-Lendrum DH, Brito MEF, Shaw JJ, Davies CR. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999;93(5):488-494.
29. Neves DP. Parasitologia humana. São Paulo: Atheneu; 2010. p.41-84.
30. Amato VS, Tuon FF, Amato Neto V. Parasitologia: uma abordagem clínica. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 89-94.
31. Bailey H, Bishop WJ. Leishman-Donovan bodies and donovianiasis. Brit. J. verner. Dis. 1959;35(1):8-9.
32. Ross R. Further notes on Leishman`s bodies. British Medical journal. 1903;2(2239):1401.
33. Peters W, Killick-Kendrick R. The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Vol. 1. Biology and Epidemiology. Academic Press. 1988;96: 642-642.
34. Migone EE. Un caso de Kalazar em Assución (Paraguay). Bulletin societe pathologic exotique. 1913;6:116-120.
35. Veronese R, Focassi R. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu; 1996.(2)1234-1259.
36. MSB – Ministério da Saúde do Brasil; 2006. “Manual de Controle da Leishmaniose visceral”. [Online]. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/svs>>. Acessado em abril, 2011.
37. Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Veterinary Parasitology. 2007;149(3-4):139-146.

38. Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Mickelson K, Falqueto A, Corey R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*. 1997;25(5):1240-1242.
39. Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulálio MC, Sampaio DP, Badaro R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998;59(1):53-57.
40. Palatnik-de-Souza CB, Santos WR, Franca-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001;65(5):510-517.
41. Moraes-Silva E, Antunes FR, Rodrigues MS, da Silva Julião F, Dias-Lima AG, Lemos-de-Sousa G, de Alcântara AC, Reis EA, Nakatani M, Badaró R, Reis MG, Pontes-de-Carvalho L, Franke CR. Domestic swine in a visceral leishmaniasis endemic area produce antibodies against multiple *Leishmania infantum* antigens but apparently resist to *L. infantum* infection. *Acta Tropical*. 2006;98(2):176-182.
42. Ribeiro JM. Vector salivation and parasite transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987;82:1-3.
43. Lawyer PG., Ngumbi PM, Anjili CO, Odongo SO, Mebrahtu YB, Githure JI, Koech DK, Roberts CR. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg*. 1990;43(1):31-43.
44. Secundino NFC, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PFP. *Lutzomyia longipalpis* Peritrophic matrix: formation, structure and chemical composition. *J Med Entomol*. 2005;42(6):928-938.
45. Sacks DL, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interaction in Leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:453-483.
46. Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*. 2002;124(5):498-507.
47. Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MAJ, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*. 2004;430(6998):463-467.

48. Saraiva EM, Pimenta PF, Brodin TN, Rowton E, Modi GB, Sacks DL. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* on *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*. 1995;111(3):275-287.
49. MSB - Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. Série A. Normas e Manuais Técnicos, Brasília; 2011. 1 ed., 112p.
50. MSB - Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em saúde subcoordenação zoonose vetorial e raiva. Norma técnica n. 48/2011 UVR/CGDT/DEVEP/SVS/MS. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_48_2011_diagnostico_lvc_19_9_2011>. Acessado em abril, 2012.
51. FUNED - Fundação Ezequiel Dias. Funed valida teste mais rápido para leishmaniose visceral canina. FUNED, Minas Gerais, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.isaude.net/pt-BR/noticias/6636/geral/funed-valida-teste-mais-rapido-para-leishmaniose-visceral-canina>>. Acesso em: 4 de outubro de 2013.
52. Bisugo MC, Araújo MFL, Taniguchi HH, Acunha ES, Andréa A, Spessoto Júnior M, et al. Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using recombinant antigen K39 in endemic regions of São Paulo state, Brazil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 2007;5(2):185-193.
53. São Paulo (Estado). Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN e Coordenadoria de Controle de Doenças - CCD. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo/São Paulo, 2006. 1 ed. 161p.
54. Harrus S. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Veterinari Microbiology*. 2002;86(4):361-368.
55. Ikeda-Garcia FA; Feitosa MM. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Clínica Veterinária*. 2007;71(12):34-42.
56. Leal CRB. Métodos disponíveis e possíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral americana canina. *Boletim Epidemiológico Paulista*. 2009; 69(6):14-18.
57. Luciano RM, Luchesis SB, Trocarelli MZ, Luciano DM, Langoni H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na

resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. 2009;46(3):181-187.

58. Lopes MG, Mendonça IL, Fortes KP, Amaku M, Pena HFJ, Gennari SM. Presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* em dogs from Piauí. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 2011;20(2):111-114.

59. Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, Souza CM, Figueiredo FB. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. Veterinary Parasitology. 2011;179(1-3):257-261.

60. Reithinger R, Dujardim JC. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current status and future applications. J Clin Microbiol. 2007; 45(1):21-25.

61. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol 2003;41:3147-3153.

62. Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing american cutaneous leishmaniasis. Acta. Tropica 2003;90(1):31-37.

63. Cupolillo E, Grimaldi Junior G, Momen H. A general classification of New World Leishmania using numerical zymotaxonomy. Am J Trop Med Hyg. 1994;50(3):296-311.

64. WHO - World Health Organization. Control of the Leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization Tech. Rep. Ser. 1990;793:1-158.

65. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Ann Parasitol Hum Comp. 1990;65(3):111-25.

66. Schallig HDFH, Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. Trop. Med. Int. Health. 2002;7(8):641-651.

67. Ferreira EC, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, Schallig H, Gontijo CM. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. Vet Parasitol. 2007;146(3-4):235-241.

68. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42(11):5249-5255.
69. van der Meide WF, Schoone GJ, Faber WR, Zeegelaar JE, de Vries HJ, Ozbel Y, Lai A, Fat RF, Coelho LI, Kassi M, Schallig HD. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(11):5560-5566.
70. Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodríguez A, Alvar J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet.* 2002;359(9312):1124-1125.
71. Garcia AL, Kindt A, Quispe-Tintaya KW, Bermudez H, Llanos A, Arevalo J, Bañuls AL, De Doncker S, Le Ray D, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infect. Genet. Evol.* 2005; 5(2):109-116.
72. Bossolasco S, Gaiera G, Olchini D, Gulletta M, Martello L, Bestetti A, Bossi L, Germagnoli L, Lazzarin A, Uberti-Foppa C, Cinque P. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41(11):5080-5084.
73. De Doncker S, Hutse V, Abdellati S, Rijal S, Singh KBM, Decuypere S, Jacquet D, Le Ray D, Boelaert M, Koirala S, Dujardin JC. A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 2005; 99(1):25-31.
74. Maurya R, Singh RK, Kumar B, Salotra P, Rai M, Sundar S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(7): 3038-3041.
75. Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraeve W, Pirmez C, Grimaldi G Jr, Fernandes O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J. Infect. Dis.* 1998;178(3):911-914.
76. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in Leishmaniasis. *Lancet.* 2005;366(9496):1561-1577.
77. Odiwuor SO, Saad AA, De Doncker S, Maes I, Laurent T, El Safi S, Mbuchi M, Büscher P, Dujardin JC, Van der Auwera G. Universal PCR assays for the differential detection of all Old World *Leishmania* species. *Eur. J.Clin. Microbiol. Infect. Dis* 2011;30(2):209-218.

78. Quispe-Tintaya KW, Laurent T, Decuypere S, Hide M, Bañuls AL, De Doncker S, Rijal S, Cañavate C, Campino L, Dujardin JC. Fluorogenic assay for molecular typing of the *Leishmania donovani* complex: taxonomic and clinical applications. *J. Infect. Dis.* 2005;192(4):685-692.
79. Noyes HA, Reyburn H, Baley JW, Smith D. A Nested-PCR-Based Schizodeme Method for Identifying *Leishmania* Kinetoplast Minicircle Classes Directly from Clinical Samples and Its Application to the Study of the Epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J Clin Microbiol.* 1998;36(10):2877-2881.
80. Fernandes O, Bozza M, Pascale JM, de Miranda AB, Lopes UG, Degrave WM. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania (Viannia)*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1996;91(3):279-284.
81. Fu G, Kolesnikov AA. *Leishmania gymnodactyli* and *Leishmania infantum* minicircles contain the same guide RNA genes as do minicircles of *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;67(1):171-4.
82. Passos VM, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CMF, Degrave W, Romanha AJ. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta. Trop.* 1999;72(3):251-258.
83. Gomes AHS, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, Garcia AS, Araujo MF, Pereira-Chiocola VL. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 2007;144(3-4):234-241.
84. le Fichoux Y, Quaranta JF, Aueuvre JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, Rousseau D, Kubar J. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37(6):1953-1957.
85. Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36(7):1989-1995.
86. Kullberg M, Nilsson MA, Arnason U, Harley EH, Janke A. Housekeeping genes for phylogenetic analysis of eutherian relationships. *Mol. Biol. Evol.* 2006;23(8):1493-1503.
87. Lee CN, Cavanagh HM, Lo ST, Ng CS. Human papillomavirus infection in non-neoplastic uterine cervical disease in Hong Kong. *Br. J. Biomed. Sci.* 2001;58(2):85-91.

88. Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 2009;164(2-4):118-123.
89. Grimaldi GJ, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto I, de-Azevedo CT, Falqueto A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;106(1):54-59.
90. Mohammadiha A, Mohebbali M, Haghghi A, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, Yeganeh F, Kazemi B, Taghipour N, Akhoundi B. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. *Exp Parasitol.* 2013;133(1):89-94.
91. Choudhry, A, Guru PY, Saxena RP, Tandon A, Saxena KC. Enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of kala-azar in Bhadohi (Varanasi), India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990;84(3):363-366.
92. Gomes AHS, Armelin IM, Menon SZ, Pereira-Chiocola VL. *Leishmania (V.) braziliensis*: Detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology.* 2008;119(3):319-324.
93. Mathis A, Deplazes P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33(5):1145–1149.
94. Martín-Sánchez J, Pineda JA, Morillas-Márquez F, García-García JA, Acedo C, Macías J. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70(5):545-548.
95. Amro A, Gashout A, Al-Dwibe H, Alam MZ, Annajar B, Hamarsheh O, Shubar H, Schönian G. First Molecular Epidemiological Study of Cutaneous Leishmaniasis in Libya. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2012;6(6):1700.
96. Barker DC, Bruijn M, Eresh S, Smyth A. Diagnosis of leishmaniasis using PCR on parasite DNA extracted from human biopsy samples, aspirates, sand flies and culture. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1991;86:73–74.
97. Laskay T, Miko TL, Negesse Y, Solbach W, Röllinghoff M, Frommel D. Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1995;89(3):273–275.

98. Pirmez C, Trajano VS, Paes-Oliveira Neto M, da-Cruz AM, Gonçalves-da-Costa SC, Catanho M, Degrave W, Fernandes O. Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(6):1819–1823.
99. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas FS, Lionel F, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(4):1435–1439.
100. Silva ES, Pacheco RS, Gontijo CMF, Carvalho IR, Brasil RP. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Rev. Inst. Med. Chem. trop. S. Paulo*. 2002;44(3):145-149.
101. Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes UG. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*-a mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1994;89(3):463-469.
102. Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2002;40(1):210-215.
103. Sundar S, Rai M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 2002;9(5):951-958.
104. Costa CHN, Pereira HF, Araujo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Revista de Saúde Pública*. 1990;24(5):361–372.
105. Presotto D, Casanova C, Castagna C, Savani ESMM, Nasser JT, Baldini MBD, Rangel O, Rodrigues RCA, Hiramoto RM. Vigilância epidemiológica da leishmaniose visceral americana (LVA) em cães do município de Campinas, estado de São Paulo, Brasil. *Revista saúde* 2010; 4(1): 94.
106. Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J. Clin. Microbiol*. 1999;37(9):2931–2935.
107. Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Davies CR. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia) spp.* in dog blood and bone marrow. *J. Clin. Microbiol*. 2000;38(2):748–751.

108. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. LeisVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites&Vectors*. 2011;4:86-102.
109. Quinnell, RJ, Courtenay, O, Davidson, S, Garcez, L, Lambson, B, Ramos, P, Shaw, JJ, Shaw, MA, Dye, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*. 2001;122(3):253-261.
110. Fallah E, Khanmohammadi M, Rahbari S, Farshchian M, Farajnia S, Hamzavi F, Asl AM. Serological survey and comparison of two polymerase chain reaction (PCR) assays with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(4):648-656.
111. Costa CHN. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2008;24(12):2959-2963.
112. Costa CHN. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2011;44(2):232-242.
113. Soares MRA, de Mendonça IL, do Bonfim JM, Rodrigues JA, Werneck GL, Costa CHN. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Tropica*. 2011;117(1):6-9.