



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

CAMPUS DE BOTUCATU

Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

**Caracterização genotípica de amostras de *Leishmania* spp.
isoladas de cães de área endêmica para Leishmaniose Visceral
Canina no estado de São Paulo**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais

Carla Janeiro Coiro

Botucatu -São Paulo

2014

Carla Janeiro Coiro

**Caracterização genotípica de amostras de *Leishmania* spp.
isoladas de cães de área endêmica para Leishmaniose Visceral
Canina no estado de São Paulo**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais

Orientador Prof. Titular Helio Langoni

Co-orientador Dr. Rodrigo Costa da Silva

Botucatu – São Paulo

2014

Dedico este Trabalho à meus pais

Que são a minha base, meu porto seguro, fonte inesgotável de apoio, motivação e amor, e a quem eu me espelho todos os dias da minha vida. Obrigada por acreditarem sempre, muitas vezes quando nem eu mesma acreditava.

Agradecimientos

Agradeço primeiramente aos meus Pais, por me darem a vida, e por todo apoio, suporte, compreensão e amor nesses 9 anos longe de vocês... a distância foi grande, mas não maior do que a saudade que eu tenho de vocês todos os dias.....vocês são meu exemplo de vida e de altruísmo .

Minha irmã Julia, que apesar de tão pequena e mais nova, sempre me mostrou como é ser mulher forte e decidida. Me orgulho todos os dias de você, e estarei aqui sempre ao seu lado, te apoiando e amparando a cada passo que você der...e.nunca se esqueça, Sempre Uniti.....

Aos amigos de Botucatu!!Que são minha segunda família, grandes amigos com quem dividi momentos de alegria, descontração e aprendizado. Muitas lágrimas e muitos sorrisos compartilhados nestes nove anos.

As minhas grandes amigas Karen, Raíssa, Marcela, Laís e Gabriela. Conviver ao lado de vocês é um privilégio que tenho a oportunidade de ter todos os dias.

Ao meu orientador, pelos inestimáveis ensinamentos, por acreditar e se dedicar integralmente, abdicando muitas vezes de momentos ao lado da família. Obrigada pela oportunidade!

Ao meu co-orientador, Rodrigo, a quem tenho enorme admiração! Desde sempre me apoiando, aconselhando e ensinando. Acredite sempre, seu caminho será de muito sucesso.

A todos os amigos do laboratório, residência e departamento (Anelise, Rafaela, Gustavo Puglia, Felipe Freitas, Felipe Fornazari, Ariane, Lucilene, Mariana Kikuti, Diego Generoso) pelo companheirismo e convivência todos esses anos.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Higiene Veterinária pela acolhida e momentos de descontração!

E finalmente agradeço a Deus e a vida! Nesses últimos a distância da família foi grande, muitos obstáculos, angústias e dúvidas foram aparecendo no meio do caminho e foi graças a fé em Deus e o apoio daqueles que amo, que esta jornada está sendo completada, trazendo os frutos, a alegria e satisfação de uma mais etapa na vida estar sendo concluída.

A minha filha de quatro patas, princesa, sempre ao meu lado, dedico:

“Animais são como anjos disfarçados, vivem na terra para mostrar ao homem o que é a fidelidade”.

Agradeço ao CCZ de Bauru, pela colaboração e parceria para a realização do trabalho.

A Iniciação científica Laiza Gavioli e a residente e grande amiga Raíssa que participaram diretamente na coleta e processamento das amostras.

Agradeço a Fapesp pela bolsa de Mestrado (Processo: 2011/14425-8).

Resumo

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC), conhecida como leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar é uma antroponose, causada pelo protozoário flagelado do gênero *Leishmania*, com ampla distribuição mundial. No Brasil, o agente responsável pela doença é a *Leishmania (Leishmania) chagasi*, transmitida pela picada da fêmea do flebotômio da espécie *Lutzomyia longipalpis*, e o principal reservatório doméstico é o cão. É uma doença sistêmica grave, de curso lento e crônico, de diagnóstico complexo. Entre as estratégias de controle da LVC está o inquérito sorológico canino, com a eliminação dos cães reagentes, sendo que diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico desta enfermidade. Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, mas a respeito dos testes disponíveis para o seu diagnóstico, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade. Neste contexto, o presente projeto teve como objetivos determinar a prevalência de anticorpos para *L. chagasi*, em 164 cães capturados pelo CCZ de Bauru, SP, área epidêmica para LVC, comparar as técnicas de imunofluorescência indireta, ensaio imunoenzimático (ELISA) e aglutinação direta (DAT); determinar a carga parasitária pela técnica de PCR em tempo real, a partir da punção de linfonodo poplíteo e de medula óssea; e identificar possíveis variantes genotípicas de *Leishmania* spp a partir do sequenciamento e genotipagem, a fim de contribuir para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, a partir da análise obtida nos diferentes testes, bem como pela avaliação dos sintomas apresentados pelos animais. A sensibilidade apresentada pelas provas DAT e ELISA tendo a RIFI como padrão-ouro foi respectivamente, de 94% e 87%, enquanto a especificidade foi de 28% e 93%. Do total de amostras de sangue, linfonodo e medula óssea submetidas a PCR gênero e espécie- específica, 20 foram positivas somente para gênero, e estas foram sequenciadas e caracterizadas, obtendo perfil de clivagem de bandas e sequências comuns as espécies pertencentes ao complexo *L.donovani*.

Palavras-chave: sorologia, sequenciamento, cães, LVC, *Leishmania* spp.

Abstract

ABSTRACT

The canine visceral leishmaniasis (LVC), known as American visceral leishmaniasis (LVA) or kala-azar is a anthroponosis caused by the flagellate protozoan of the genus *Leishmania*, with worldwide distribution. In Brazil, the agent responsible for the disease is *Leishmania (Leishmania) chagasi*, transmitted by the bite of the female of the species *Lutzomyia longipalpis*, and the main reservoir is the domestic dog. It is a severe systemic disease, with chronic and slow course and complex diagnostic. Among the strategies for control of LVC are the canine serological survey, with the elimination of reagents dogs and different techniques can be used to diagnose this disease. Many advances have occurred in recent years, but about the tests available for diagnosis, none had 100% sensitivity and specificity. In this context, this project aimed to determine the prevalence of antibodies to *L. chagasi* in 164 dogs captured by the CCZ, Bauru, SP, epidemic area for LVC, to compare the techniques of indirect immunofluorescence, enzyme immunoassay (ELISA) and direct agglutination (DAT) to determine the parasite burden by PCR in real time from peripheral blood puncture, popliteal lymph node and bone marrow of animals serologically positive, and identify potential genotypic variants of *Leishmania* spp. from the sequencing in order to contribute to the diagnosis of canine visceral leishmaniasis, from the analysis obtained for the different tests as well as for assessment of symptoms presented by the animals. The sensitivity shown by DAT and ELISA with IFA as the gold standard were respectively, 94% and 87%, while specificity was 28% and 93%. Of the total sample of blood, lymph node and bone marrow subjected to PCR genus and species-specific, 20 were positive only for gender, and these were sequenced and characterized, yielding cleavage bands profile and common sequences belonging to the species *L.donovani* complex.

Keywords: serology, sequency, dogs, CVL, *Leishmania* spp.

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa do município de Bauru.....17
- Figura 2.** Esquema representativo do espaço de transcrição interno (ITS) da região ribossomal utilizando os *primers* específicos para *Leishmania*.....22
- Figura 3.** Prova de aglutinação direta (DAT). Fileira1, representada pelo antígeno puro, fileiras 2 e 3 pelos controles positivos, fileiras 4 e 5 pelos controles negativos e o restante correspondem as amostras com registro 2, 3 e 5.....28
- Figura 4.** Padrão de amplificação pela PCR-ITS1 de diferentes espécies de *Leishmania*. 1) *Leishmania major* IOC 581, 2) *Leishmania infantum* IOC 2906, 3) controle negativo da PCR, 4) *Leishmania donovani* IOC 2272, 5) *Leishmania chagasi* IOC 2906, 6) *Leishmania braziliensis* IOC L0566, 7) *Leishmania amazonensis* IOC R1142 e 8) *Leishmania guyanensis* IOC L0565.....31
- Figura 5.** Reação de digestão com a enzima HaeIII dos produtos de PCR amplificados com os *primers* LITRS e L5.8S. Padrão de peso molecular (100 bp), colunas de 1 a 7 correspondem a digestão dos produtos amplificados de 7 controles de *Leishmania*. 1- *L. major* IOC 581, 2- *L.guyanensis* IOC L0565, 3- *L. amazonensis* IOC R1142, 4- *L.braziliensis* IOC L0566, 5- *L.donovani* IOC 2272, 6- *L.infantum* IOC 2906 e 7- *L.chagasi* IOC 2906. B) Aumento da reação de digestão destacando os produtos amplificados dos controles *L.donovani*, *L.infantum* e *L.chagasi*, mostrando padrão semelhante no perfil de clivagem das bandas.....36
- Figura 6.** Reação de digestão com a enzima HaeIII dos produtos de PCR amplificados com os *primers* LITRS e L5.8S. (M) Padrão de peso molecular (100 bp), colunas de 1 a 10 correspondem a digestão dos produtos amplificados em diferentes amostras de cães positivos somente para a PCR gênero, apresentando o mesmo perfil de bandas dos controles correspondentes do complexo *L.donovani*.....37

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativa \pm erro padrão (EST \pm EP) e intervalo de confiança 95% (IC95%) da avaliação estatística para as técnicas sorológicas de imunoenensaio enzimático (ELISA), desconsiderando-se as zonas cinzas, e teste de aglutinação direta (DAT), em soros de cães do CCZ do município de Bauru, SP.....	29
Tabela 2. Correlação entre os títulos de anticorpos obtidos pela RIFI e DAT em amostras de soros de cães do CCZ de Bauru-SP.....	30
Tabela 3. Concordância entre os resultados da RIFI e PCR para <i>Leishmania</i> spp. para sangue em animais do CCZ de Bauru, SP.....	32
Tabela 4. Concordância entre os resultados da RIFI e PCR para <i>Leishmania</i> spp. para linfonodo em animais do CCZ de Bauru, SP.....	33
Tabela 5. Concordância entre os resultados da RIFI e PCR para <i>Leishmania</i> spp. para medula óssea em animais do CCZ de Bauru, SP.....	33
Tabela 6. Concordância entre os resultados da PCR e qPCR para sangue em animais do CCZ de Bauru, SP.....	34
Tabela 7. Concordância entre os resultados da PCR e qPCR para linfonodo em animais do CCZ de Bauru, SP.....	34
Tabela 8. Concordância entre os resultados da PCR e qPCR para medula óssea em animais do CCZ de Bauru, SP.....	35
Tabela 9. Correlação entre os resultados da pesquisa de anticorpos pela RIFI e a carga parasitária pela qPCR para as diferentes amostras nos animais amostrados do CCZ de Bauru, SP.....	35
Tabela 10. Sequenciamento das amostras positivas para gênero quando comparadas a sequências de <i>Leishmania</i> depositadas no GenBank.....	38

Lista de Quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sequência, número de pares de base do produto e condições de ciclagem no protocolo ITS1-PCR.....	23
---	----

Sumário

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Justificativa.....	13
3. Objetivos.....	15
4. Material e Métodos.....	17
4.1 Área de Estudo.....	17
4.2 Animais.....	17
4.3 Obtenção das amostras.....	18
4.4 Procedimentos laboratoriais.....	19
4.4.1 Provas sorológicas.....	19
4.4.1.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI-IgG).....	19
4.4.1.2 Imunoensaio enzimático com antígeno recombinante S7 (ELISA-S7)..	20
4.4.1.3 Teste de Aglutinação Direta (DAT).....	21
4.4.2 Provas moleculares.....	21
4.4.2.1 Extração de DNA.....	22
4.4.2.2 PCR para <i>Leishmania</i> spp. ITS1-DNA (gênero-específico).....	22
4.4.2.3 PCR para <i>Leishmania chagasi</i> (espécie-específica).....	23

4.4.2.4 Real-time PCR: determinação da carga parasitária.....	24
4.4.2.5 Sequenciamento.....	24
4.4.2.6 ITS1-RFLP.....	25
4.5 Análise de resultados.....	25
5.Resultados.....	28
5.1 RIFI, DAT e ELISA.....	28
5.2 PCR convencional gênero e espécie-específica.....	30
5.3 PCR convencional e qPCR.....	33
5.4 RIFI e qPCR.....	35
5.5RFLP e Sequenciamento.....	36
6.Discussão.....	40
7.Considerações Finais.....	49
8.Referências Bibliográficas.....	51

*“Feliz é aquele que pode conhecer as causas das coisas e
calçar aos pés os medos e o destino inexorável.”*

Virgílio (Enéida)

Introdução

1. Introdução

A leishmaniose é uma enfermidade infecciosa zoonótica de caráter crônico e de distribuição mundial, causada por diferentes espécies de protozoários digenéticos da Ordem Kinetoplastidae, Família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*^{1,2,3}. Apresenta-se como uma das mais complexas doenças tropicais, de ampla diversidade clínica e epidemiológica.⁴

Encontra-se entre as seis doenças endêmicas parasitárias de prioridade para a Organização Mundial de Saúde⁵, amplamente distribuída pelo mundo (21 espécies patogênicas para o homem), ocorrendo em 98 países, com mais de 2.000.000 de casos novos em seres humanos por ano, e mais de 350 milhões de pessoas com risco de infecção.¹

Apresenta duas classificações epidemiológicas importantes: zoonose, que inclui animais hospedeiros como reservatórios no ciclo de transmissão, e antroponose, na qual o homem se apresenta como fonte de infecção para o mosquito vetor.⁶

Considerada anteriormente uma enfermidade comum em áreas rurais, sofreu ao longo dos anos, uma alteração marcante nesse perfil epidemiológico, com grande número de casos em grandes centros urbanos^{7,8}, onde o cão acaba por exercer um papel extremamente importante na manutenção da doença⁹, sendo considerado o principal reservatório doméstico.^{10,11}

A ocorrência de leishmaniose em países em desenvolvimento é alta, sendo os aspectos sociais, econômicos e ambientais extremamente importantes para a sua manutenção e propagação¹². Devido a isso, recomendações ligadas aos cuidados em áreas peridomésticas, mantendo o ambiente limpo e livre de matéria orgânica, tem sido muito útil na redução da incidência da doença em áreas de ocorrência em humanos.¹³

Dentre os diferentes fenótipos associados a doença estão: leishmaniose visceral (LV), geralmente letal quando não tratada; leishmaniose muco-cutânea (LMC), caracterizada como uma doença mutiladora; leishmaniose cutânea difusa (LCD), doença provocada por uma resposta imune celular deficiente; e leishmaniose cutânea (LC), que causa o aparecimento de inúmeras ulcerações na pele dos pacientes. O Continente Americano é local de ocorrência de três das

quatro síndromes clínicas da doença, entre elas, a forma visceral, cutânea e muco-cutânea.¹⁴

A leishmaniose visceral (LV) é considerada a mais severa dentre todas as formas clínicas da doença, conhecida também como calazar ou febre dum-dum. É caracterizada por febre intermitente, hepatoesplenomegalia, anemia e debilidade progressiva, levando frequentemente a óbito. Duas espécies do complexo donovani transmitem a doença para o homem: *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (syn. *L.chagasi*)^{15,16}. Alguns pesquisadores acreditam que a *L. chagasi* e a *L. infantum* sejam a mesma espécie¹⁷ em função de suas características bioquímicas e moleculares semelhantes. Rioux et al¹⁸ em sua proposta de uma nova classificação para o gênero *Leishmania* já haviam sugerido que *L.chagasi* passasse a ser sinônimo de *L.infantum* por respeito às regras de nomenclatura. Thomaz-Soccol¹⁹ em sua classificação geral para *Leishmania* do Novo Mundo propuseram a manutenção de sinônimo. Assim como estudos recentes, que apontam ser indistinguíveis as espécies *L.chagasi* e *L.infantum*, reafirmando-se a manutenção da sinônimo já proposta anteriormente^{20,21}.

A doença tem distribuição geográfica mundial, com ocorrência em 47 países, concentrando-se em seis: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão²². A prevalência da LV é estimada em 400.000 a 600.000 casos novos por ano, com 50.000 mortes.²³ No sudoeste da Europa, no norte e leste da África, a LV é causada por *L.infantum*. Na Etiópia, Sudão, Índia e Ásia é causada principalmente pela *L.donovani*, sendo que no Sudão alguns casos também são relatados por *L.infantum*²⁴. Nas Américas há registro da doença e do parasito tanto na América do Sul como na América Central.^{25,26}

Dentre os países da América Latina, o Brasil representa 90% dos casos reportados de leishmaniose visceral com incidência de dois casos por 100 mil habitantes¹⁴, sendo considerada endêmica em 21 estados com notificações de 3.187 casos por ano, principalmente na região Nordeste, vindo a seguir a região norte com a maior notificação de casos humanos em 2009, representados principalmente pelo estado do Tocantins, com 428 casos, e do Pará com 275 casos e por último o Centro-Oeste do país⁴. Estudos têm relatado também a ocorrência de casos na região Sul do país.^{19,8,27}

No estado de São Paulo, a doença canina foi identificada no município de Araçatuba em 1998, e desde então, já foi descrita em 100 municípios, difundindo-se para outras regiões do estado, inclusive com casos autóctones identificados na região metropolitana da cidade de São Paulo a partir do ano de 2005²⁸. Entre 2.500 e 5.000 casos são reportados da doença, sendo que 600 deles encontram-se no estado de São Paulo²⁹. De acordo com a Secretaria do Estado, 291 pessoas foram diagnosticadas com a doença, com 23 óbitos no ano de 2008²⁸, enquanto que do ano de 2010 a 2013, este número foi de 579, com 40 óbitos²⁹.

Apresenta como hospedeiros vertebrados os cães e o homem e, como hospedeiro invertebrado insetos pertencente ao gênero *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* no Velho Mundo. Nos hospedeiros vertebrados parasitam as células do sistema fagocitário mononuclear de órgãos profundos e, sendo que o cão desempenha papel fundamental na epidemiologia, principalmente devido á riqueza do formas amastigotas na pele³⁰. O cão doméstico (*Canis familiares*) é o principal reservatório da *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) no meio urbano³¹, cujas enzootias costumam preceder a ocorrência em humanos, sendo um importante parâmetro na estimativa de casos humanos.

Discute-se também o papel do gato na manutenção da infecção, visto que Silva et al.³² registraram o primeiro caso de leishmaniose visceral em um gato em Belo Horizonte detectado pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) e xenodiagnóstico. Outros dois estudos de vigilância conduzidos em áreas endêmicas no Sudeste do Brasil mostraram resultados expressivos, sendo 6/200 (6,5%) e 8/200 (4%) gatos positivos para leishmaniose^{33,34} e Vides et al.³⁵ ao realizarem estudo em 55 gatos do município de Araçatuba encontraram 27 animais (49%) positivos para leishmaniose visceral.

Já no ambiente silvestre as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis marsupialis*) representam as principais fontes de infecção para o vetor.³⁶

As alterações clínicas mais frequentemente observadas em cães são a linfadenopatia, alterações dermatológicas, hepato e esplenomegalia, emaciação e onicogribose, sendo constatados quadros de artrite, alterações neurológicas e respiratórias¹⁰. Em estudo realizado por Troncarelli et al.³⁷ em 100 amostras de cães positivos para LVC, no município de Bauru-SP, os sinais relacionados a emaciação (60%), esplenomegalia (57%) e alopecia (51%) obtiveram mais

destaque, enquanto Moreira et al.³⁸ e Feitosa et al.³⁹ observaram maior prevalência de linfadenomegalia ao estudarem cães naturalmente infectados da região de Araçatuba-SP.

O período de incubação é bastante variável tanto para seres humanos como para cães. Em humanos varia de 10 dias a 24 meses, em média de dois a quatro meses. No cão varia de três a sete meses, sendo que, em alguns casos a doença pode ocorrer anos após a infecção.²⁸

No Brasil, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) foi originalmente considerada uma endemia das áreas rurais, porém desde 1980 a doença teve um avanço gradual para os grandes centros⁴⁰. A urbanização da LVC foi resultado de: destruição das florestas em larga escala com posterior adaptação do flebotômio a nichos nos centros urbanos⁴¹ e a intensa migração das áreas rurais para grandes centros ocorrida entre 1960 e 1970, que levou a agregação de cães da área rural no ciclo de transmissão no meio urbano⁴². O Centro de Controle de Doenças do estado de São Paulo indica que cerca de 1.227 animais foram infectados por *Leishmania chagasi* de 2006 a 2010.⁴³

Bauru é considerada uma região endêmica para LVC, e se destaca pelo número alto de casos, tanto em cães, como em humanos. No ano de 2007, um total de 4325 cães foram eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses, sendo que destes, 78,77% possuíam sorologia positiva. De janeiro a março do ano de 2008, 84,76% cães eutanasiados possuíam sorologia positiva²⁸. O que se nota é que apesar dos altos índices da enfermidade, a região ainda apresenta uma lacuna em estudos sobre a prevalência de LVC³⁷, convergindo para a necessidade de mais pesquisas que possam elucidar pontos importantes sobre sua epidemiologia e transmissão.

O diagnóstico clínico é difícil e inconclusivo, tendo em vista a presença de sinais comuns a outras enfermidades, além do fato de uma grande porcentagem de animais serem assintomáticos ou oligoassintomáticos⁴⁴ destacando-se ainda que estes cães mesmo assintomáticos são fontes de infecção para os flebotômios e, conseqüentemente, têm papel ativo na transmissão da doença³⁶. Em torno de 60% a 80% de cães vivendo em áreas consideradas endêmicas podem ter contato com o parasito e não desenvolver sinais clínicos da doença, ficando inaparentes por longos períodos⁴⁵.

Estudos dos fatores de risco para a LVC no Brasil, até o momento, não evidenciaram predisposição sexual, racial ou etária relacionada com a infecção.⁴⁶

Métodos laboratoriais confiáveis se tornaram extremamente importantes para acurácia do diagnóstico⁴⁷ e para o processo de eliminação de reservatórios infectados⁴⁸. As técnicas empregadas para este fim devem ser providas de certas propriedades, como: capacidade de detecção da infecção em sua fase inicial, resultados precisos, fácil execução, baixo custo e repetibilidade. A escolha do teste deve ser feita após cuidadosa avaliação, levando em consideração variáveis como características epidemiológicas da doença, dados de prevalência e incidência, hospedeiros envolvidos, modo de transmissão e período de incubação.⁴⁹

Entretanto, o desempenho insatisfatório dos métodos de diagnóstico para LVC, tem subestimado o número de cães infectados, dificultando assim o controle da doença. Atualmente, apesar da grande variedade de métodos, ainda não está disponível um antígeno altamente específico e que seja empregado com método fácil de execução⁴⁸. Por essa razão, o diagnóstico correto da LVC ainda é um desafio⁵⁰, e a confiabilidade será proporcionada pela combinação de técnicas.⁴⁹

Atualmente, realizam-se testes parasitológicos, testes sorológicos e moleculares, que apresentam pontos positivos e negativos intrínsecos a cada técnica.

No Brasil, a eliminação de cães infectados é recomendado pelo Ministério da Saúde como medida de controle da LV, devido a isso um diagnóstico de baixo custo e alta confiabilidade se mostra necessário. Com o intuito de se evitar a utilização de métodos invasivos e levando em consideração que a resposta humoral na LVC se apresenta de maneira intensa, com altos níveis de imunoglobulinas, focou-se então no diagnóstico a partir de métodos sorológicos.

51

Dentre estes métodos, destaca-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), empregada desde a década de 1960. É um método que utiliza o parasita íntegro com antígeno⁵², e foi preconizado pelo Ministério da Saúde para a confirmação da infecção.⁵³

Este método apresenta limitações, sua aplicação requer alto nível de habilidade e experiência, utilização de aparelhagem específica e de alto custo para leitura, no caso o microscópio de imunofluorescência. Além disso, as diluições seriadas tornam o teste laborioso e inviável para uma triagem com grande número de amostras⁵⁴. Destacando também, a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos⁵⁵ a soronegatividade de cães positivos e a inconclusão da doença ativa a partir de um resultado positivo³⁶. Entretanto, era considerado o teste de eleição para inquéritos epidemiológicos por fornecer diagnóstico rápido, e por apresentar sensibilidade de 72-100% e especificidade de 100%⁵⁶. No Brasil, títulos iguais ou superiores a 1:40 obtidos na RIFI são considerados positivos.⁵

A hemaglutinação ou teste de aglutinação direta (DAT), desenvolvido na década de 1980 por Tomizawa⁵⁷, permite a detecção de imunoglobulinas contra uma variedade de parasitos, dentre eles do gênero *Leishmania*. Inicialmente, foi desenvolvido para o diagnóstico humano, mas tem sido muito usado atualmente na LVC⁴⁹. É um teste simples, de alta sensibilidade, especificidade, de fácil manuseio e que não requer equipamentos especializados⁵⁸. Suas limitações são notadas pelo longo tempo de incubação (18 h), a incapacidade de distinção entre infecções e dificuldades na padronização e controle de qualidade do antígeno. Muitos pesquisadores obtêm elevadas sensibilidades ao usar esta técnica, de 91 a 100%, porém os valores de especificidade são frequentemente baixos, de 58% até 72%.⁵⁹

O teste de ELISA também muito utilizado na rotina laboratorial e a campo, foi desenvolvido por Engvall & Perlmann⁶⁰ e consiste na reação entre o soro do animal e os antígenos solúveis e purificados de *Leishmania*, obtidos a partir de cultura *in vitro*. Os anticorpos específicos das amostras se fixam aos antígenos e em seguida é adicionado uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, que se liga aos anticorpos presentes.⁶¹

Pode ser realizado com diferentes antígenos, desde antígenos brutos, sintéticos ou recombinantes⁴¹ que fornecem resultados diferentes quanto à especificidade e sensibilidade⁶². Pode ser aplicado para grande número de amostras em curto espaço de tempo, por isso muitos esforços foram e estão sendo concentrados para melhoria dos antígenos utilizados neste teste.⁴⁸

Vários antígenos recombinantes de *Leishmania* tem sido testados como forma de melhorar o diagnóstico da LVC, como p. ex., a proteína recombinante K39, que tem sido estudada amplamente sob a forma recombinante (rK39). Os antígenos recombinantes, de uma maneira geral, aumentam a especificidade dos testes quando comparado aos antígenos brutos ⁴¹. Entretanto, o desempenho do teste no diagnóstico da LVC não está relacionado somente com o tipo de antígeno utilizado, mas também com o estado clínico apresentado pelo animal testado. ⁶³

O único kit ELISA comercializado, ELISA/S7®, tem como base um peptídeo recombinante, produzido por engenharia genética, que permite segundo o fabricante, a detecção de anticorpos na fase mais precoce da infecção.

Trata-se de um ensaio relativamente simples e rápido, considerado uma alternativa para a RIFI. É reconhecido pelo MAPA como tendo elevadas especificidade e sensibilidade, o emprego do antígeno no kit confere aproximadamente 95% de especificidade e sensibilidade ao teste. Devido a isso, tem sido extensamente adotado para o sorodiagnóstico do calazar canino no Brasil ⁶⁴. Assim como o ELISA rK39, o teste possui grande potencial para ser usado a campo, por ser facilmente aplicável e interpretado visualmente; todos os passos serem conduzidos em temperatura ambiente e apresentar reagentes estáveis por um longo período de tempo.

Apesar da grande variedade de métodos diagnósticos disponíveis no Brasil, os testes sorológicos RIFI e ELISA (disponíveis na forma de kits produzidos pelo Instituto de Tecnologia e Imunobiológicos Bio-Manguinhos) eram recomendados e distribuídos pelo Ministério da Saúde (MS) para avaliar a soroprevalência em inquéritos caninos.

O ELISA era recomendado para a triagem dos cães e a RIFI para teste confirmatório dos cães reagentes no teste de ELISA ⁵. Aguiar et al.⁶⁵ descreveram que o uso dos dois métodos é interessante, pelo fato do ELISA permitir simultaneamente a análise de um grande número de animais de modo rápido e a RIFI poder ser usada para confirmar a especificidade das amostras positivas, o que é essencial para o diagnóstico da leishmaniose.

Entretanto, no ano de 2011, por meio de nota técnica conjunta 01/2011, o MS substituiu o protocolo de diagnóstico para a LVC existente, utilizando o DPP

(teste rápido) para a triagem e o ELISA como teste confirmatório. O teste sorológico Dual Path Platform (DPP®) é um teste rápido qualitativo, imunocromatográfico com antígenos recombinantes. É recomendado pelo Ministério da Saúde como rotina para todos os Centros de Controle de Zoonoses a nível nacional ⁶⁶. O teste DPP® utiliza a proteína recombinante K39 (rK39) como antígeno, uma sequência de 39 aminoácidos clonada da região quinase específica de *L. chagasi* que tem sido amplamente avaliada no diagnóstico da LV canina. É caracterizado por ser rápido, e de fácil manipulação, pois não precisa de pessoa especializada para a sua execução. Os graus de sensibilidade e especificidade de testes imunocromatográficos mostram sensibilidade que variam de 89-98% e especificidade que variam de 97-100% ⁶⁷.

O diagnóstico parasitológico é realizado a partir da observação direta de formas amastigotas do parasito em esfregaços de órgãos linfóides (linfonodos ou medula óssea), biopsias de baço e fígado ou de escarificações de pele ⁶⁸. Alguns desses procedimentos, embora ofereçam a vantagem da simplicidade, são métodos invasivos, gerando riscos para o animal e dificuldades de execução em programas de saúde pública, em que um grande número de animais deve ser avaliado em curto espaço de tempo. Pode-se considerar que a detecção do parasito constitui o padrão ouro no diagnóstico da LVC ⁴⁹, por apresentar especificidade que chega a 100%, apesar da sensibilidade ser variável, uma vez que a distribuição tecidual não é homogênea ⁴⁴.

O tipo de material biológico coletado, o tempo de leitura da lâmina, e o grau de parasitemia também são fatores importantes para a sensibilidade do teste, que fica em torno de 80% para cães sintomáticos e inferiores para cães assintomáticos. ^{5,69}

Os aspirados de medula e linfonodos são os mais usados pelos médicos veterinários para diagnosticar a doença, porém estes métodos podem gerar resultados falso-negativos devido ao baixo grau de parasitos presentes nas amostras ⁵¹. A sensibilidade pode ser de 50 a 83% em amostras de medula óssea, entre 30 a 85% em amostras de linfonodo e entre 71 a 91% quando ambos os tecidos estão combinados. Quando utilizados aspirados do baço, fica em torno de 98%, entretanto, o risco de coleta é muito maior, inviabilizando sua utilização. ⁷⁰

Na presença de parasitismo intenso, a prova parasitológica oferece um diagnóstico rápido e seguro; contudo, em muitos casos, especialmente em animais assintomáticos, nos quais apenas poucas formas amastigotas estão presentes nos tecidos, o diagnóstico torna-se difícil e duvidoso. A utilização de técnicas mais sensíveis para a detecção de parasitos, tais como a imunofluorescência direta (RIFD) e a imunistoquímica, pode ser uma maneira de solucionar esse problema ⁷⁰.

Outros métodos parasitológicos consistem na cultura *in vitro* de fragmentos de tecidos ou aspirados e também na inoculação em animais de laboratório (hamsters). A cultura de parasitos pode apresentar sensibilidade de 77%, e por serem necessários meses para se verificar a positividade da amostra, são testes que normalmente não são empregados na rotina ⁵⁰. Variantes do método parasitológico são a imunistoquímica e os métodos moleculares. ⁴⁸

Diante das limitações dos métodos sorológicos e parasitológicos apresentadas, as técnicas moleculares adquirem destaque no cenário atual. É realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com amplificação e identificação seletiva da seqüência de DNA de interesse, constituindo assim uma nova perspectiva para o diagnóstico da LV ⁷¹.

A detecção do DNA do parasito é possível em uma variedade de tecidos, incluindo medula óssea, biópsias cutâneas, aspirados de linfonodos, sangue, urina, soro, cortes histológicos de tecidos parafinados e também no vetor. ⁷²

Vários pesquisadores têm enfatizado a utilidade da PCR, devido à alta sensibilidade e especificidade, em torno de 100% ⁷³, além da possibilidade de identificar e determinar de forma rápida a carga parasitária presente pela PCR em tempo real (qPCR), aspecto de suma importância quando se pretende estudar a imunopatologia e comparar testes sorológicos em um mesmo animal⁷⁴, além de servir como uma ferramenta muito útil tanto para epidemiologistas quanto para os clínicos. ⁷⁵

O diagnóstico da LV utilizando a PCR convencional tem avançado nos últimos anos por características importantes como: o aumento da sensibilidade do teste com a otimização de protocolos que permitem a detecção do parasita mesmo antes do aparecimento de qualquer sintoma clínico; utilização da PCR para monitorar a carga parasitária e a tipificação da espécie envolvida. ¹⁶

Os métodos moleculares tem contribuído enormemente também para o desenvolvimento epidemiológico, a partir da diferenciação das espécies, método previamente só possível pela análise bioquímica (perfil isoenzimático) ⁷⁶. Essa habilidade em se distinguir as espécies de *Leishmania* é crucial para o correto diagnóstico e prognóstico da doença. ⁷⁷

Dentre as várias abordagens moleculares utilizadas na caracterização de variantes genéticas em espécies do gênero *Leishmania*, pode ser citado o sequenciamento do DNA a partir do término do crescimento da cadeia, desenvolvido por Sanger e colaboradores na década de 70. Além do polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) ⁷⁸; análise por polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição RFLP de regiões ITS de DNA ribossomal e de DNA do cinetoplasto ⁷⁹; análise de regiões amplificadas de sequência confirmada ⁸⁰; análise por hibridização de sondas de DNA (Southern blotting) ⁸¹, e análise de regiões de DNA com marcadores microssatélites. ^{82,83,84,85}

A ITS1-RFLP (espaço de transcrição interna) é a técnica mais utilizada para a detecção e identificação de espécies de *Leishmania* no Novo Mundo. Em protocolo descrito por Schonian e colaboradores ⁸⁶, mostrou-se possível o diagnóstico diferencial da maioria das espécies de *Leishmania* de importância médica pela digestão com a enzima de restrição HaeIII do fragmento amplificado pela PCR. Apesar de representantes do complexo *L. donovani* (*L. donovani* e *L. infantum*) ou do complexo *L. braziliensis* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*) apresentarem quase o mesmo padrão entre si, o sequenciamento dos produtos de 350 bp da PCR ITS1 pode elucidar a espécie final envolvida. ⁸⁶

Devido ao padrão epidemiológico diversificado, nota-se uma grande dificuldade no controle desta enfermidade, sendo necessária a adoção de várias medidas entre as quais podem ser citadas a redução de vetores, eliminação de reservatórios, proteção pessoal e ações de vigilância, devendo-se considerar ainda a dificuldade na obtenção de diagnóstico rápido e seguro ⁸⁷. Neste contexto é importante a associação de técnicas diagnósticas, nas condições a campo para que o diagnóstico seja o mais preciso possível. ⁸⁸

Considerando-se, portanto, o impacto negativo da leishmaniose visceral canina para a saúde pública, a importância do seu diagnóstico, e a correlação de provas utilizadas para este fim, incluindo-se a carga parasitária, o

sequenciamento e caracterização do agente, o presente estudo pretendeu obter melhor entendimento da epidemiologia da doença, melhorar a sensibilidade diagnóstica assegurando-se a decisão correta quanto ao destino final de cães encaminhados para exame, sequenciar e caracterizar os amplicons, contribuindo para o controle da LVC em áreas endêmicas.

Justificativa

2. Justificativa

Contribuir para a escolha e utilização de testes diagnósticos precisos, de fácil e rápida execução, e de baixo custo, que possam ser utilizados na rotina diagnóstica da LVC, um problema crescente em todo país e relevante em saúde pública. A associação da resposta imune humoral com a carga parasitária permitirá compreender melhor os aspectos de imunopatologia desta enfermidade, assegurando ainda a indicação de testes diagnósticos com melhor sensibilidade. Além disso, o sequenciamento e identificação de isolados de *Leishmania* permitirão identificar possíveis variantes genotípicas de *Leishmania* spp. presentes em área endêmica do Estado do São Paulo.

Objetivos

3. Objetivo Geral

Determinar a prevalência de cães positivos para leishmaniose visceral canina (LVC) no Município de Bauru, pela utilização de três métodos sorológicos; associar a PCR convencional espécie-específica à carga parasitária obtida pela qPCR, e determinar os perfis genotípicos dos prováveis isolados de *Leishmania* spp.

3.1 Objetivos Específicos

- Comparar as provas sorológicas de RIFI e ELISA-antígeno recombinante e DAT;
- Realizar PCR convencional gênero e espécie-específica (*Leishmania chagasi*) das amostras de sangue, punção de linfonodo e medula óssea;
- Determinar a carga parasitária de amostras de sangue, punção de linfonodos e de medula óssea positivas para *Leishmania chagasi*, pela da técnica de Real-time PCR.
- Sequenciar as amostras positivas para *Leishmania* spp. na PCR convencional e caracterizar os agentes isolados analisando-se a homologia com sequências disponíveis em bancos de dados do GenBank.
- Caracterizar pela RFLP as amostras de *Leishmania* spp.

Material e Métodos

4. Materiais e Métodos

4.1 Área de Estudo

A cidade de Bauru se localiza na região centro-oeste do estado de São Paulo, possui uma área total de 702 Km², com 120 km² de perímetro urbano (17% da área total) (Figura 1). As coordenadas geográficas do município são: latitude 22° 18' 55" e longitude 49° 3' 41" Oeste. Possui vegetação natural conservada que consiste de Cerrado e Mata Atlântica, totalizando 3771 hectares. Os índices pluviométricos variam de 33 a 286 mm por ano, a temperatura média anual é de 22,6 °C. ⁸⁹

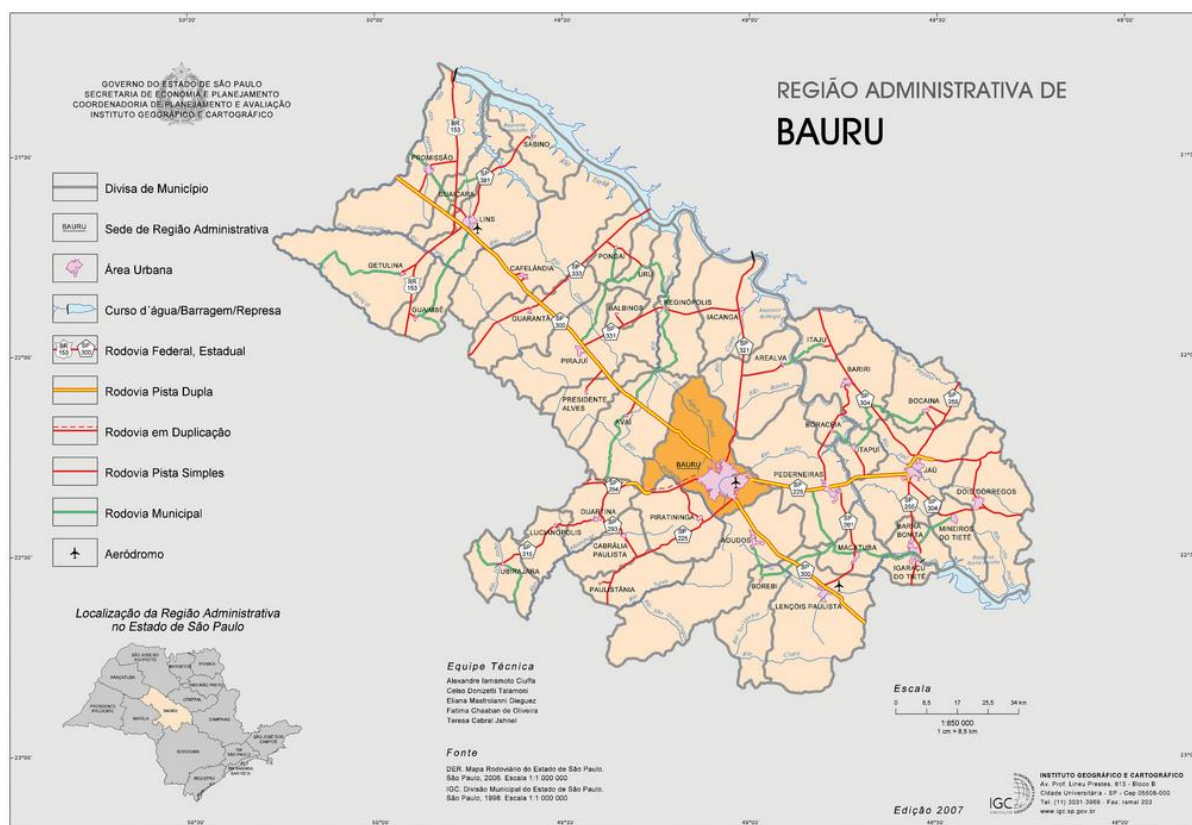


Figura 1. Mapa do município de Bauru

4.2 Animais

Utilizou-se o programa Epi Info⁹⁰ para se determinar o cálculo do número de amostras (n). Considerando-se uma população humana de 344.039 habitantes no município de Bauru, SP, segundo o último censo⁹¹, e uma proporção da população humana em relação a canina de 5:1, estimou-se a população canina de 61.593 animais no município de Bauru, SP, e utilizando como referência uma prevalência esperada de LVC (diagnóstico clínico e laboratorial) de 70,1%⁹², nível de significância (α) de 5%, nível de confiança de 95% e margem de erro de 5%, obteve-se um n de 164 animais.

Os cães estudados foram capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Bauru, SP, sem predileção por sexo, raça ou idade. Amostras de sangue foram coletadas previamente a eutanásia dos mesmos, bem como punção de linfonodo poplíteo e de medula óssea. Todas as provas diagnósticas foram realizadas nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, SP.

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEUA, da FMVZ, UNESP, protocolo n°260/2011- CEUA.

4.3 Obtenção das amostras

As amostras de sangue total foram obtidas por venopunção jugular ou cefálica, utilizando-se seringas e agulhas (ou scalpels) descartáveis, para coleta de 5 a 10 ml de sangue em tubo de vidro sem EDTA e com EDTA.

No caso das amostras de sangue utilizadas para a obtenção do soro, foi realizada a centrifugação a 1600 x g por 10 minutos, com posterior acondicionamento em microtubos plásticos devidamente identificados com o número de protocolo e data da coleta, e armazenamento a -20°C para a realização das provas sorológicas DAT, RIFI e ELISA.

Do material obtido do sangue coletado com EDTA, da punção aspirativa da medula óssea (na crista ilíaca ou na ponta do esterno, em seringa de 10 ml, com anticoagulante EDTA), e do linfonodo poplíteo (movimentos de leque e homogeneizados em solução salina tamponada de fosfatos (SST), 0,01M, pH 7,2 estéril), foram realizadas a extração do DNA, PCR convencional e em tempo real (qPCR), e caracterização e sequenciamento do agente.

4.4 Procedimentos laboratoriais

Para a pesquisa de anticorpos para *Leishmania* pelos métodos de Imunofluorescência indireta (RIFI), Imunoensaio Enzimático (ELISA) e Aglutinação Direta (DAT) utilizou-se o soro dos animais obtidos a partir das amostras de sangue sem EDTA.

Com o material obtido da punção de linfonodo e aspirado de medula óssea realizou-se a PCR convencional e qPCR com posterior sequenciamento e caracterização das amostras positivas.

4.4.1 Provas sorológicas

4.4.1.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI-IgG)

A pesquisa de anticorpos para *Leishmania chagasi* foi realizada pela Reação de Imunofluorescência Indireta ⁹³, sendo utilizadas as diluições 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640. As amostras foram diluídas em microplaca, pipetando-se 190 µL de Solução Salina Tamponada (SST) e 10 µL de soro a ser testado no primeiro orifício (diluição 1:20). A seguir distribui-se 100 µL de SST nas cinco cavidades, pipetando-se 100 µL da primeira diluição para a seguinte, após homogeneização, procedendo-se assim até a quinta cavidade, desprezando-se os 100 µL desta última diluição. Tal procedimento foi repetido com amostra do soro positivo (controle positivo) e outro negativo (controle negativo). Seguindo-se o protocolo, indicando a posição de cada soro em teste, incluindo-se os controles positivos e negativos, na lâmina fixada com o antígeno, foi distribuído 10 µL de cada diluição do soro nos orifícios.

A seguir as lâminas foram incubadas a 37° C, em câmara úmida por 30 minutos, e lavadas com SST por 10 minutos em coplin, procedendo-se duas lavagens após secagem em estufa 37°C.

O conjugado específico foi diluído segundo o seu título previamente estabelecido, em solução de azul de Evans, diluída em SST na proporção de 1:5, distribuindo 10 µL do conjugado para cada diluição nas lâminas, incubando-se por 30 minutos, a 37° C em câmara úmida. Após a realização de duas lavagens com SST pH 7,2, e secagem em estufa, as lâminas foram montadas com

glicerina tamponada pH 8,5 e lamínula 24 mm X 60 mm, examinando-se em microscópio de Imunofluorescência (aumento de 40 X).

Após a leitura dos controles, foi considerado como título final a maior diluição do soro com fluorescência completa na borda de pelo menos 50 % das promastigotas, sendo o ponto de corte de positividade (diluições iguais ou superiores a 1:40), equivalente ao título de 40 UI.

O antígeno para a sensibilização das lâminas foi produzido com promastigotas de *L. major* mantidas em tubos rosqueados contendo 9 ml de meio LIT e 5 ml de meio NNN no Núcleo de Pesquisa em Zoonoses. As lâminas foram sensibilizadas com a suspensão de promastigotas e mantidas em laminário à -20°C, até o momento do uso.

4.4.1.2 Imunoensaio enzimático com antígeno recombinante S7 (ELISA-S7)

As amostras de soro foram armazenadas a -20°C, e no momento da análise submetidas ao teste sorológico, utilizando os “kits” para diagnóstico de leishmaniose canina do laboratório Biogene (ELISA/S7®, Biogene Indústria e Comércio Ltda).

O Imunoensaio enzimático baseia-se no reconhecimento de anticorpos específicos por antígenos solúveis fixados em um suporte plástico, sendo revelado por meio de uma proteína conjugada a uma enzima (peroxidase) permitindo a visualização da reação. O kit é composto de uma placa de ELISA e de todos os reagentes necessários à realização de 96 reações, sendo utilizada para a leitura das placas, a leitora por espectrofotômetro com filtro de 450nm, da marca MULTISKAN EX.

Foram consideradas positivas as amostras de soros que tiveram as densidades ópticas acima do ponto de corte. Segundo validação do Laboratório Biogene, é indicado que a DO do controle reagente se apresente sempre superior a 0,300 e os valores dos controles não reagentes sempre abaixo de 0,100. O cálculo do ponto da análise foi feito a partir da média das DO dos soros não reagentes, somado ao fator $R=0,142$, determinando assim a amplitude da zona cinza (faixa de indeterminados) e subtraído do ponto de corte 0,03.

Em casos de animais na faixa cinza, o fabricante do Kit do ELISA S7 indica a coleta de nova amostra após 30 dias à primeira, a fim de confirmar o resultado.

4.4.1.3 Teste de Aglutinação Direta (DAT)

O teste de aglutinação direta (DAT) foi realizado conforme descrito por Garcez et al. ⁹⁴, com algumas modificações. Formas promastigotas de *L. (L.) major* foram cultivadas em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino até atingir a fase estacionária de crescimento. Os parasitos foram lavados cinco vezes com solução de Locke. O sedimento foi suspenso a 1/20 em solução de Locke contendo 0,4% de tripsina e incubado durante 45 minutos, a 37°C. Os parasitos foram novamente lavados e ressuspensos para a concentração de 2×10^8 promastigotas/ml. Adicionou-se igual volume de formaldeído 2% em solução de Locke e a suspensão foi mantida a 4°C *overnight*. Os parasitos foram lavados três vezes com solução fisiológica e ressuspensos em solução fisiológica contendo 0,02% do corante Comassie Brilliant Blue, de modo a conter 1×10^8 promastigotas/ml, mantendo-se sob agitação moderada durante 90 minutos. A seguir foi centrifugado a $3200g/4^\circ/10\text{min}$ e novamente lavado três vezes com solução fisiológica. A concentração foi ajustada finalmente para 1×10^8 promastigotas/ml em solução fisiológica contendo 1% de formaldeído, e a seguir filtrada em nylon. A suspensão final foi estocada a 4°C em frasco âmbar até utilização como antígeno.

Os soros foram inicialmente diluídos a partir de 1/20 em solução diluente em microplacas com poços em V, e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. A seguir foi adicionado igual volume da suspensão de antígeno, mantendo-se à temperatura ambiente, *overnight*. Como controle sabidamente utilizou-se solução diluente e também amostras de soros controles sabidamente positivos e negativos.

O valor de corte para positividade (títulos significativos) foi o mesmo utilizado na RIFI.

4.4.2 Provas moleculares

4.4.2.1 Extração de DNA

A extração e purificação de DNA foram realizadas a partir dos materiais oriundos da coleta de sangue, das punções de linfonodos e de medula óssea, utilizando-se kit de extração Illustra blood genomic Prep. Mini spin kit (GE

Healthcare Life Sciences do Brasil Ltda.[®]), conforme instrução do fabricante. Sendo realizada para todos os animais independente do resultado sorológico.

4.4.2.2 PCR para *Leishmania* spp. ITS1-DNA (gênero-específico)

O protocolo utilizado para a amplificação da região ITS1 do DNA ribossomal se baseou na análise dos genes codificadores da ssU rRNA e 5.8S rRNA (Figura 2), pelos *primers*: LITSR (sense) e L5.8S (antisense) segundo protocolo de El Tai et al ⁹⁵.

Toda reação da PCR foi otimizada a partir da utilização da temperatura de anelamento, das concentrações dos primers, dos DNTP's, dos íons Mg, da Taq Polimerase e da quantidade correta e adequada de ciclos.

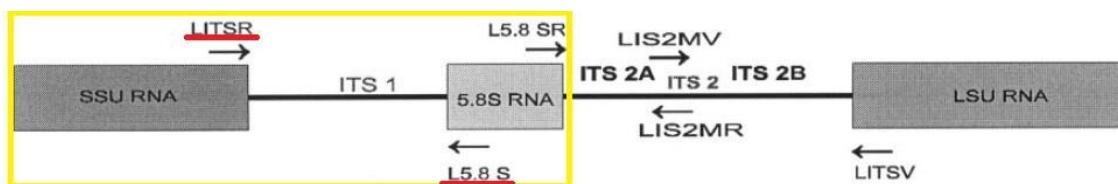


Figura 2. Esquema representativo do espaço de transcrição interno (ITS) da região ribossomal utilizando os *primers* específicos para *Leishmania*. Fonte: El Tai et al ⁹⁵.

As condições de amplificação em termociclador (Thermocycler EP Gradient) foram: a desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguido de 34 ciclos a 95°C durante 20 segundos, 53°C durante 30 segundos e 72°C durante 60 segundos e uma extensão final de 72°C durante 6 minutos.

As informações a respeito dos *primers* e das condições de ciclagem podem ser observadas no quadro 1.

Quadro 1. Sequência, número de pares de base do produto e condições de ciclagem no protocolo ITS1-PCR. Fonte: Schonian et al.⁸⁶

Assay	Primers	Ref.	Product (bp)	Annealing t°	PCR condition (final concentration)	Cycling protocol	Cycle numbers
ITS1-PCR	LITSR: 5' CTGGATCATTTCGGATG L5.88: 5' TGATACCACTTATCGCACTT	El Tai et al., 2000	300- 350*	53°	4,0 mM MgCl ₂ 200 μM dNTP's 500 nM primers 2 U Taq pol 1,5 mM MgCl ₂	annealing: 30 sec extension: 60 sec	35
* differs with different species of <i>Leishmania</i>							

As amostras com resultado negativo, foram submetidas a nested-PCR, seguindo protocolo de Schonian et al.⁸⁶. Utilizou-se 2 microlitros do produto da ITS1-PCR, sob a mesma combinação de *primers* e condições da PCR da primeira amplificação, a fim de aumentar a sensibilidade da prova.

A identificação dos produtos amplificados tanto na PCR, quanto na nested-PCR, foi realizada em eletroforese em gel de agarose 1,5%. Para isso, alíquotas de 10 μL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2 μL de solução de azul de bromofenol, submetida à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5X, contendo 0,1mg/mL de brometo de etídio.

4.4.2.3 PCR para *Leishmania chagasi* (espécie-específico)

Em sequência as amostras foram submetidas a PCR convencional espécie-específica. Foram utilizados os oligonucleotídeos: **LC14 250-273 (5' CGCACGTTATATCTACAGGTTGAG3')** e **LC15 416-439 (5' TGTTTGGGATTGAGGTAATAGTGA3')**, desenhados a partir de estudos realizados no Laboratório de Biologia Molecular –Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública-UNESP-Botucatu.

Para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores foram usados os programas Primer3 e PrimerBLAST, direcionados para o gene “*Leishmania chagasi* kinetoplast minicircle DNA”, AF169138.1 [GenBank].

As condições de amplificação em termociclador (Thermocycler EP Gradient) foram: a desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 59°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos e uma extensão final de 70°C durante 10 minutos.

4.4.2.4 Real-time PCR: determinação de carga parasitária

As amostras de sangue, aspirado de linfonodos e medula óssea positivas na PCR convencional foram submetidas à qPCR. Para a determinação da carga parasitária foi utilizado o sistema SYBR®Green, por meio do equipamento StepOne™ Plus Real Time PCR System (Life Technologies). Para a realização da curva-padrão foram utilizadas amostras de DNA de cepa *Leishmania chagasi* IOC 2906 (nas concentrações decrescentes de 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹, 10⁰ parasitas/ml. Foram utilizados os *primers* Lc14 e Lc15 para *L. chagasi*.

Para cada amostra de DNA, foi utilizado 12,5 µL de Power SYBR® Green PCR master Mix (Life Technologies), 5 µM de cada *primer*, 8,5 µL de água ultrapura e 2 µL de amostra totalizando um volume final de 25 µL. As seguintes condições foram utilizadas: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 1 minuto e uma etapa para a curva de dissociação de 95°C por 15s, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15s.

O sinal de fluorescência foi adquirido nos passos de extensão do ciclo de amplificação. Todas as amostras foram processadas em triplicata. A quantidade de DNA presente nas amostras foi expressa em relação à curva-padrão que foi adicionada em cada ensaio. Os resultados foram visualizados e analisados no programa StepOne™ Software v2.0.

4.4.2.5 Sequenciamento

Os amplicons foram purificados empregando-se o Montage® PCR Centrifugal Filter Devices, P36461 (Millipore, EUA) e a seguir quantificados por eletroforese em gel de agarose. O sequenciamento foi realizado para confirmar

a identidade dos amplicons na reação de PCR com sequências de *Leishmania* spp. depositadas na base de dados do GenBank.

As reações de sequenciamento foram feitas em sequenciador automático Applied Biosystems 3100 (Applied Biosystems) empregando-se o ABI BigDye kit e GE DYEnamic ET terminator kit (GE Healthcare) e analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12. As seqüências sense e antisense obtidas foram alinhadas e visualizadas em software BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0, na forma de eletroferograma, submetidas ao BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), comparadas com as seqüências depositadas nos bancos de dados. Para a correlação das sequencias de interesse entre si, foi utilizado o programa Multiple Sequence Aligment by Clustalw para a confecção de dendograma.

Todo o processo do sequenciamento foi realizado no Instituto de Biociências, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Campus de Botucatu.

4.4.2.6 ITS1-RFLP

Análise pela RFLP de amplificado ITS1-DNA

Os produtos positivos na ITS1-PCR e negativos para *Leishmania chagasi* foram submetidos a digestão pela enzima de restrição HaeIII, segundo protocolo descrito previamente por Schonian et al ⁸⁶. Os fragmentos foram separados em gel de agarose 2%, em torno de uma a duas horas, de maneira a obter os diferentes padrões de bandas para cada espécie, podendo assim caracterizar aquelas presentes no município de Bauru.

4.5. Análise dos resultados

Análise estatística

Todos os dados foram tabulados em planilha Excel. A relação entre os testes com variáveis dicotômicas (positivo, negativo) foram analisados pela força de sua concordância pelo teste de kappa (κ), assim como determinado o desvio padrão e o intervalo de confiança 95%. A correlação entre os títulos de anticorpos na RIFI e DAT foi analisada pelo coeficiente de correlação de Spearman (r_s). As correlações entre os títulos de anticorpos na RIFI e a carga

parasitária determinada pela qPCR em cada amostra estudada foram analisadas pelo coeficiente de correlação linear de Pearson (r). Estatísticas associadas à performance dos resultados obtidos pelo ELISA (desconsiderando-se a zona cinza e DAT foram calculadas tendo a RIFI como padrão-ouro, utilizando-se a planilha descrita por Mackinnon⁹⁶. Todas as análises foram realizadas utilizando-se os programas Epi Info 3.5.1 e BioEstat 5.0.⁹⁷

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 RIFI, DAT e ELISA

Das 164 amostras analisadas, 112 (68,29%) foram positivas á RIFI e 143 (87,2%) á DAT. Em ambas as provas utilizou-se como ponto de corte o título 40UI. As amostras positivas na DAT, com títulos de 640, foram testadas para diluições superiores, sendo 20480 a maior realizada (Figura 3).



Figura 3. Prova de aglutinação direta (DAT). Fileira1, representada pelo antígeno puro, fileiras 2 e 3 pelos controles positivos, fileiras 4 e 5 pelos controles negativos e o restante correspondem as amostras número 2, 3 e 5.

A prova de ELISA apresentou positividade de 74,39% (122/164), com 12 animais categorizados na faixa cinza (inconclusivos). Entretanto, apesar da indicação do fabricante de realização de novo exame, durante o estudo não foi possível tal protocolo, devido ao fato destes animais terem sido eutanasiados imediatamente após a coleta dos materiais, pelo Centro de Controle de Zoonoses, e por isto desconsiderados, no momento da avaliação estatística.

O soro controle reagente no ELISA apresentou Densidade Óptica de 0,393 e os valores dos controles não reagentes de 0,058 e 0,048, confirmados

pelo critério de validação do Laboratório Biogene. A média dos controles negativos ou não-reagentes foi 0,052, e os valores para diagnóstico sorológico das amostras para ponto de corte foi 0,194 e para faixa de indeterminados 0,164.

As variáveis sensibilidade e especificidade das provas sorológicas foram avaliadas utilizando-se a RIFI como prova-padrão ouro. Os resultados obtidos para a DAT foram 94,6% e 28,8%, respectivamente e para o ELISA de 86,9% e 93,3%, podendo ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Estimativa \pm erro padrão (EST \pm EP) e intervalo de confiança 95% (IC95%) da avaliação estatística para as técnicas sorológicas de imunoenensaio enzimático (ELISA), desconsiderando-se as zonas cinzas, e teste de aglutinação direta (DAT), em soros de cães do CCZ do município de Bauru, SP.

Estatística	ELISA		DAT	
	EST \pm EP	IC95%	EST \pm EP	IC95%
Sensibilidade	86,9 \pm 3,1	79,6 – 92,3	94,6 \pm 2,1	88,7 – 98,0
Especificidade	93,3 \pm 4,6	77,9 – 99,2	28,8 \pm 6,3	17,1 – 43,1
Eficiência*	88,2 \pm 2,6	81,9 – 92,8	73,8 \pm 3,4	66,4 – 80,3
Valor preditivo positivo	98,2 \pm 1,3	93,5 – 99,8	74,1 \pm 3,7	66,1 – 81,1
Valor preditivo negativo	63,6 \pm 7,3	47,8 – 77,6	71,4 \pm 3,7	47,8 – 88,7
Falso positivo	6,7 \pm 4,6	0,8 – 22,1	71,2 \pm 6,3	56,9 – 82,9
Falso negativo	13,1 \pm 3,1	13,1 – 3,1	5,4 \pm 2,1	2,0 – 11,3
Kappa (κ)	68,2 \pm 6,8	54,9 – 81,5	28,0 \pm 7,5	13,2 – 42,7
Concordância positiva	92,2 \pm 1,8	88,6 – 95,8	83,1 \pm 2,5	78,2 – 88,1
Concordância negativa	75,7 \pm 5,6	64,8 – 86,6	41,1 \pm 7,3	26,9 – 55,3

Legenda: * índice de classificação correto

Ao correlacionar os dados referentes aos títulos de anticorpos na DAT e RIFI, observou-se pela análise do coeficiente de Spearman ($r_s=0,3667$; $P<0,0001$) uma diferença significativa, com concordância positiva e moderada

entre as duas provas, ou seja, à medida que os títulos dos animais aumentaram na prova da RIFI aumentaram também na DAT. (Tabela 2)

Tabela 2. Correlação entre os títulos de anticorpos obtidos pela RIFI e DAT em amostras de soros de cães do CCZ de Bauru-SP.

RIFI	DAT							TOTAL
	0*	20*	40	80	160	320	640	
0*	14	1	6	5	10	3	13	52
20*	0	0	0	0	0	0	0	0
40	1	0	0	0	0	1	2	4
80	2	0	1	0	2	7	3	15
160	3	0	2	1	2	4	10	22
320	0	0	1	0	4	3	14	22
640	1	0	0	9	3	9	27	49
TOTAL	21	1	10	15	21	27	69	164

Estatística: Coeficiente de correlação de Spearman (r_s) = 0,3667; $P < 0,0001$;
Interpretação: correlação moderada

Legenda: * considerado resultado negativo

5.2 PCR convencional gênero e espécie-específico

A análise das amostras de sangue, linfonodo e medula óssea pela PCR foi realizada, inicialmente, para gênero-específico (Figura 4), e posteriormente para espécie-específico, em particular para *Leishmania chagasi*, com o intuito de encontrar as amostras que seriam positivas somente para gênero, podendo caracterizar a espécie envolvida.

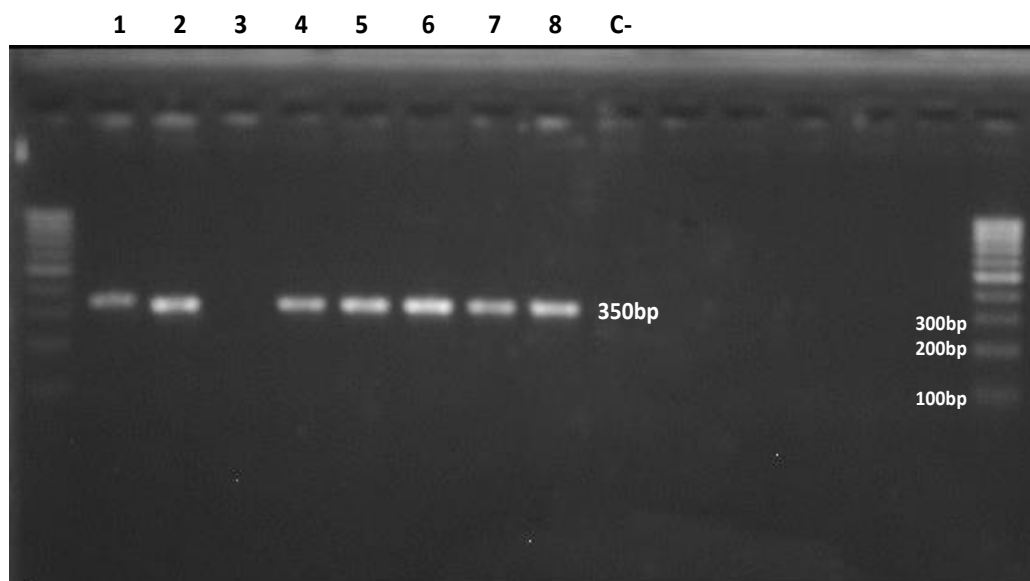


Figura 4. Padrão de amplificação pela PCR-ITS1 de diferentes espécies de *Leishmania*. 1) *Leishmania major* IOC 581, 2) *Leishmania infantum* IOC 2906, 3) controle negativo da PCR, 4) *Leishmania donovani* IOC 2272, 5) *Leishmania chagasi* IOC 2906, 6) *Leishmania braziliensis* IOC L0566, 7) *Leishmania amazonensis* IOC R1142 e 8) *Leishmania guyanensis* IOC L0565.

Todas as amostras foram submetidas a ITS1-PCR para gênero e no caso de resultado negativo, realizou-se a Nested- PCR, visando aumentar a sensibilidade da prova.

Das 164 amostras de sangue avaliadas pela PCR, 56 (34,15%) foram positivas para gênero e 46 (28%) para *Leishmania chagasi*. Com relação as amostras de linfonodo, 102 (62,2%) foram positivas para gênero e 94 (57,3%) para espécie. Nas amostras de medula óssea, obteve-se 70,1% (115/164) e 69,5% (114/164) de positividade, para gênero e espécie respectivamente.

Das 56 amostras de sangue positivas para gênero, somente 12 (21,4%) apresentaram positividade após a realização da Nested-PCR. Enquanto, que para as amostras de linfonodo e medula óssea, esse procedimento se mostrou imprescindível em 13/102 (12,7%) e 4/115 (3,47%).

Do total de amostras positivas para gênero independente do material analisado, 10 amostras de sangue, 9 de linfonodo e uma de medula óssea não foram positivas para *Leishmania chagasi*. Estas amostras foram submetidas a caracterização pela RFLP- ITS1 e sequenciadas, a fim de se identificar a espécie envolvida na infecção e presente na região de Bauru.

Ao correlacionar a PCR para gênero e a RIFI utilizou-se o índice Kappa. Este teste visou avaliar a concordância nos resultados das duas provas, analisando se um serviria de triagem ou não para a outra.

Quando testadas as amostras de sangue a concordância obtida foi baixa, mostrando que a PCR de sangue não seria, neste caso, e para este tipo de amostra, uma boa prova para a triagem em inquéritos soropidemiológicos, no caso o teste sorológico se mostrou mais fidedigno, pois do total de animais positivos na RIFI (112), somente 52 apresentaram positividade na PCR (Tabela 3).

Tabela 3. Concordância entre os resultados da RIFI e PCR para *Leishmania* spp. para sangue em animais do CCZ de Bauru, SP.

RIFI	PCR – <i>Leishmania</i> spp.		
	Positivo	Negativo	TOTAL
Positivo	52	60	112
Negativo	4	48	50
TOTAL	56	108	164

Estatística: Índice kappa (κ) = 0,3006 \pm 0,0549 (IC95% 0,1930 – 0,4083)

No caso das amostras de linfonodo a concordância apresentada foi mais forte que no anterior, e assim considerada moderada. O número de animais positivos e negativos para ambas as técnicas ao mesmo tempo aumentou, e diminuiu o número de positivos em uma técnica e negativos em outra. Esse padrão foi semelhante para as amostras de medula óssea. (Tabelas 4 e 5)

Tabela 4. Concordância entre os resultados da RIFI e PCR para *Leishmania* spp. para linfonodo em animais do CCZ de Bauru, SP.

RIFI	PCR – <i>Leishmania</i> spp.		
	Positivo	Negativo	TOTAL
Positivo	86	26	112
Negativo	14	38	52
TOTAL	100	64	164

Estatística: Índice kappa (κ) = 0,4696 \pm 0,0710 (IC95% 0,3305 – 0,608)

Tabela 5. Concordância entre os resultados da RIFI e PCR para *Leishmania* spp. para medula óssea em animais do CCZ de Bauru, SP.

RIFI	PCR – <i>Leishmania</i> spp.		
	Positivo	Negativo	TOTAL
Positivo	97	15	112
Negativo	18	34	52
TOTAL	115	49	164

Estatística: Índice kappa (κ) = 0,5281 \pm 0,0718 (IC95% 0,3873 – 0,6689)

5.3 PCR convencional e qPCR

Além da PCR convencional, as amostras de sangue, linfonodo e medula óssea, foram avaliadas de modo a quantificar a carga parasitária pela PCR em tempo real. Esta prova como já citado, foi realizada, utilizando os mesmos *primers* específicos para *Leishmania chagasi*, objetivando-se obter a correlação entre estas duas provas, observando assim a eficácia de cada uma quanto a sensibilidade e especificidade, visto que o limiar de detecção da qPCR convergia com positividade observada na PCR convencional

Por se tratar de números contínuos, no momento da análise foi necessário estipular como positivo aqueles animais que apresentavam acima de um parasito, e como negativo a ausência do parasita. A carga parasitária em sangue periférico não ultrapassou 126 parasitas/ml sendo mais comumente

detectado 1 a 50 parasitas/ml. Por outro lado, em medula óssea e linfonodos a carga parasitária passou de 5000 parasitas/ml, além disso, as quantidades de DNA detectadas se distribuíram com maior frequência na categoria acima de 1000 parasitas/ml.

A concordância com a PCR foi de 0,8759 (Índice kappa (κ) = $0,8759 \pm 0,0427$ /IC95% 0,7922 – 0,9595) para as amostras de sangue, 0,8902 (Índice kappa (κ) = $0,8902 \pm 0,0354$ /IC95% 0,8210 – 0,9595) para linfonodo e 0,8368 (Índice kappa (κ) = $0,8368 \pm 0,0447$ /IC95% 0,7492 – 0,9245) para medula óssea. Estes valores apresentados mostraram praticamente uma concordância perfeita.

No caso das amostras de sangue, o resultado de oito animais foram discordantes na análise das duas provas. Para linfonodo em nove animais e para medula óssea em 12 animais. (Tabelas 6, 7 e 8)

Tabela 6. Concordância entre os resultados da PCR e qPCR para sangue em animais do CCZ de Bauru, SP.

PCR – <i>L. chagasi</i>	PCR quantitativa		
	Positivo	Negativo	TOTAL
Positivo	40	6	46
Negativo	2	116	118
TOTAL	42	122	164

Estatística: Índice kappa (κ) = $0,8759 \pm 0,0427$ (IC95% 0,7922 – 0,9595)

Tabela 7. Concordância entre os resultados da PCR e qPCR para linfonodo em animais do CCZ de Bauru, SP.

PCR – <i>L. chagasi</i>	PCR quantitativa		
	Positivo	Negativo	TOTAL
Positivo	82	9	91
Negativo	0	73	73
TOTAL	82	82	164

Estatística: Índice kappa (κ) = $0,8902 \pm 0,0354$ (IC95% 0,8210 – 0,9595)

Tabela 8. Concordância entre os resultados da PCR e qPCR para medula óssea em animais do CCZ de Bauru, SP.

PCR – <i>L. chagasi</i>	PCR quantitativa		
	Positivo	Negativo	TOTAL
Positivo	103	12	115
Negativo	0	49	49
TOTAL	103	61	164

Estatística: Índice kappa (κ) = 0,8368 \pm 0,0447 (IC95% 0,7492 – 0,9245)

Os valores de sensibilidade e especificidade apresentadas pela qPCR para sangue foram de 86,9% e 98,3%. Para as mostras de linfonodo, encontrou-se 90,1% e 100%, respectivamente. Para medula óssea a especificidade observada também foi de 100% e a sensibilidade de 89,56%.

5.4 RIFI e qPCR

A correlação entre os títulos obtidos na RIFI e a carga parasitária avaliada pela real time mostrou não haver diferença significativa entres estas variáveis, ou seja não há correlação entre títulos altos ou baixo na sorologia e a carga parasitária, pois os valores de p obtidos foram todos superiores a 0,05. Portanto, não necessariamente um animal com título alto de anticorpos, terá também alta carga parasitária e vice versa.

Tabela 9. Correlação entre os resultados da pesquisa de anticorpos pela RIFI e a carga parasitária pela qPCR para as diferentes amostras nos animais amostrados do CCZ de Bauru, SP.

Amostra testada	Correlação de Pearson (<i>r</i>)	Intervalo de confiança 95%	Valor de <i>P</i>
Sangue	-0,0073	-0,16 a 0,15	0,9256
Linfonodo	0,0254	-0,13 a 0,19	0,7469
Medula óssea	0,1300	-0,02 a 0,28	0,0976

5.5 RFLP e Sequenciamento

As amostras positivas para ITS1-PCR e negativas para a PCR espécie-específica foram caracterizadas pela RFLP-ITS1. Destas, 10 de sangue, 9 de linfonodo e uma de medula óssea, foram submetidas a digestão pela enzima de restrição HaeIII, a fim de se observar o padrão de clivagem das bandas para cada amostra, pela comparação com controles de variadas espécies de *Leishmania* utilizadas no estudo (Figura 5).

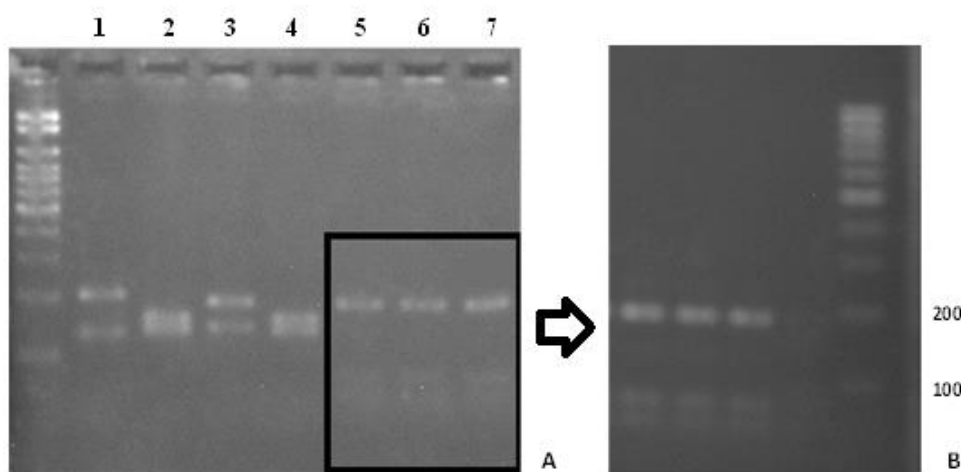


Figura 5. A) Reação de digestão com a enzima HaeIII dos produtos de PCR amplificados com os *primers* LITRS e L5.8S. Padrão de peso molecular (100 pb), colunas de 1 a 7 correspondem a digestão dos produtos amplificados de 7 controles de *Leishmania*. 1- *L. major* IOC 581, 2- *L.guyanensis* IOC L0565, 3- *L. amazonensis* IOC R1142, 4- *L.braziliensis* IOC L0566, 5- *L.donovani* IOC 2272, 6- *L.infantum* IOC 2906 e 7- *L.chagasi* IOC 2906. B) Aumento da reação de digestão destacando os produtos amplificados dos controles *L.donovani*, *L.infantum* e *L.chagasi*, mostrando padrão semelhante no perfil de clivagem das bandas.

Ao se avaliar as amostras de sangue, linfonodo e medula óssea, observou-se que todas as amostras testadas, apresentaram padrão semelhante de clivagem de bandas das espécies *L. donovani*, *L. chagasi* e *L. infantum*, sendo estas responsáveis pela forma visceral da doença, e apresentando entre si, o mesmo padrão de clivagem (Figuras 5 e 6). Devido a isso, a partir da RFLP só foi possível caracterizar as amostras testadas como pertencentes a uma dessas três espécies.

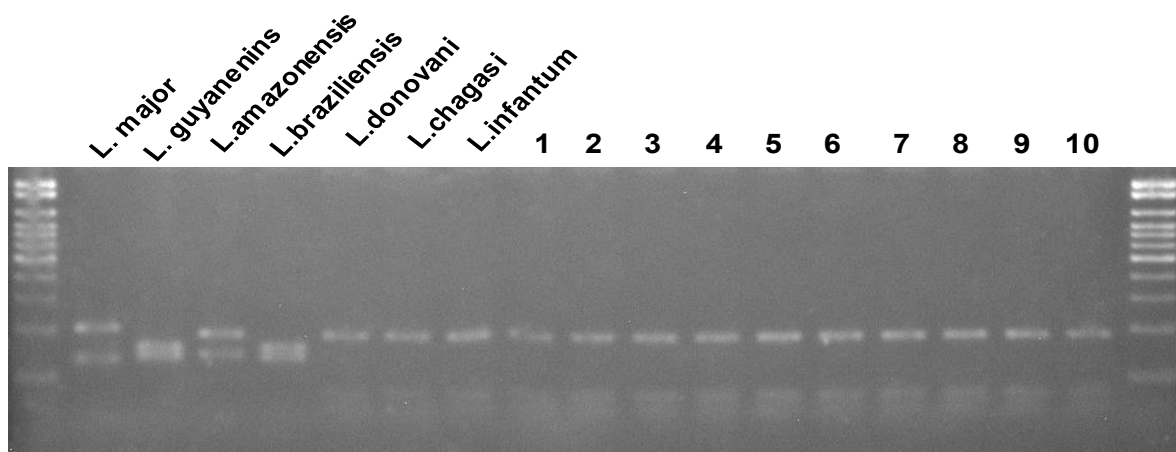


Figura 6. Reação de digestão com a enzima HaeIII dos produtos de PCR amplificados com os *primers* LITRS e L5.8S. (M) Padrão de peso molecular (100 bp), colunas de 1 a 10 correspondem a digestão dos produtos amplificados em diferentes amostras de cães positivos somente para a PCR gênero, apresentando o mesmo perfil de bandas dos controles correspondentes do complexo *L. donovani*.

Após a identificação pela RFLP, foi realizado o sequenciamento de maneira a se obter a sequência de nucleotídeos em cada uma delas comparando-as com outras pré-existentes no GenBank. Entretanto, da mesma forma que na RFLP, a análise pelo sequenciamento das 20 amostras, mostrou

alta porcentagem de similaridade (em torno de 100%), com sequências comuns e correspondentes as três espécies de *Leishmania* viscerotrópicas (Tabela 10), como na RFLP, não foi possível identificar somente uma única espécie.

Tabela 10. Sequenciamento das amostras positivas para gênero quando comparadas a sequências de *Leishmania* depositadas no GenBank.

Amostra	Acesso Blast	Max Identity
Sangue 70, 71,73,74,76,130,156,160 Medula Óssea 47 Linfonodo 32,64,65,68,100,141,154	KC998879.1 JQ730002.1 GU045591.1	100% 100% 100%
Sangue 77	JQ730002.1 HQ830353.1 GU045591.1	99% 99% 99%
Linfonodo 82	HQ830353.1 HM130608.1 GU045591.1	100% 100% 100%
Linfonodo 145	HM130608.1 KC998879.1 KC998879.1	100% 98% 99%
Sangue 94	HQ830353.1 JQ730002.1 GU045591.1	100% 100% 100%

Estes resultados, entretanto, indicam de certa maneira que a grande maioria de cães, da região de Bauru, com leishmaniose estão provavelmente parasitados com espécies de *Leishmania* responsáveis pelas formas viscerais da doença, já que todas as amostras estudadas não mostraram semelhança com os padrões de espécies responsáveis pela forma cutânea.

Discussão

6. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral canina se apresenta como umas das enfermidades com maior crescimento ao longo do anos. Este fato ocorre principalmente devido ao grande aumento da migração de humanos e animais domésticos para regiões com baixas taxas ou mesmo ausência de infecção, contribuindo dessa maneira para a dispersão da infecção²³, quando presente o vetor transmissor.

A infecção canina é o principal indicador prévio da ocorrência da infecção em humanos, sendo considerada nestes animais uma importante zoonose de caráter potencialmente fatal em regiões da Europa, África, Ásia e principalmente na América do Sul.²²

A prevalência da LVC, em algumas regiões da América do Sul encontra-se em torno de 63-80%, sendo que a região de Bauru se encaixa nesse cenário, juntamente com outras cidades de destaque do Estado de São Paulo ^{22,68}. Como visto em estudo realizado em Bauru, Troncarelli et al ⁹⁸ ao analisarem 100 amostras de soro de cães recolhidos pelo CCZ, encontraram uma prevalência de 65% de positividade para a leishmaniose.

Devido a este perfil, a realização de diferentes inquéritos epidemiológicos é considerada de suma importância, evidenciando a ocorrência da LVC em regiões antes consideradas não endêmicas para a doença^{99,100}. O diagnóstico rápido e acurado é de extrema importância, no tocante a detecção precoce do parasita e do ciclo de transmissão.

Entre as técnicas sorológicas comumente utilizadas na LVC, a RIFI era considerada padrão-ouro. Entretanto, o ELISA e a DAT tem sido reportados como testes mais sensíveis e práticos para estudos epidemiológicos.¹⁰¹

No presente estudo, do total de 164 animais analisados, 112 (68,29%) foram positivos á RIFI, 143 (87,2%) á DAT e 122 (74,39%) ao ELISA. Camargo et al.¹⁰² ao realizar em estudo na mesma região, encontraram 82% de positividade na RIFI e 80% no ELISA, mostrando prevalências ainda maiores do que as observadas no presente estudo.

É importante ressaltar que apesar de Bauru ser considerada uma região endêmica para a doença, principalmente devido á baixa taxa de eutanásia devido a recusa dos proprietários. Existe, portanto, uma lacuna muito grande de

estudos, que visem avaliar a prevalência, transmissão e evolução da doença ao longo dos anos, o que justifica e reafirma a importância do estudo realizado.

Ao avaliar a prevalência em outras regiões endêmicas, a DAT e o ELISA apresentaram maior positividade frente a RIFI, como observado neste estudo. Ferreira et al.¹⁰³ confirmaram tal fato, ao analisarem amostras provenientes da região de Belo Horizonte, sendo que de um total de 234 animais, 148 foram positivos no ELISA, 138 na DAT, e 121 na RIFI. Ressalta-se que o ponto de corte utilizado na DAT foi o mesmo utilizado no presente estudo, ou seja diluição 1:40 ou título de 40UI.

Na avaliação da especificidade e sensibilidade pela correlação dos resultados da DAT e ELISA, tendo a RIFI como padrão-ouro, observou-se que a sensibilidade das duas provas, foi alta, mesmo ao se desconsiderar os animais inconclusivos. Por outro lado, um valor muito baixo para a especificidade, ao redor de 29%, foi observado na DAT, enquanto que para o ELISA foi ao redor de 94%. Ao se avaliar os dois testes, portanto, o ELISA mostrou-se muito mais acurado, frente a baixa capacidade da DAT na detecção de animais verdadeiramente negativos, contribuindo para aumentar o número de falso-positivos.

No que se refere a especificidade, esta foi inferior a de outros estudos para a DAT. Da Silva et al.¹⁰⁴ obtiveram 100% de sensibilidade e 91% de especificidade ao estudarem amostras de cães da região de Belo Horizonte. Resultados semelhantes foram observados por Terán-Angel et al.¹⁰⁵ em amostras de cães na Venezuela, obtendo valores de sensibilidade de 92,59% e especificidade de 100%.

A sensibilidade baixa pode ser explicada pelo uso de diferentes antígenos, somado a características particulares dos parasitas circulantes em cada área, influenciando nos resultados obtidos.

A especificidade muito baixa, pode ser interpretada, pelo fato de que diferentemente da RIFI e do ELISA, a DAT não necessita a utilização de conjugado espécie-específico. Desta forma, este fato torna a DAT extremamente útil em estudos com animais silvestres, como o realizado, por Garcez et al.¹⁰⁶ em macacos experimentalmente infectados. Além de ser mais prática quanto a não utilização de equipamentos sofisticados, é menos onerosa.

Fatores como a escolha do ponto de corte também podem influenciar na especificidade desta prova. Moheballo et al.¹⁰⁷ avaliaram a diluição de 1:320 como melhor ponto de corte para análise de amostras ao utilizar a DAT, otimizando assim, principalmente os resultados da especificidade.

No presente estudo optou-se por utilizar para DAT o mesmo ponto de corte da RIFI (diluição de 1:40), o que facilitou no momento da correlação entre as duas provas. Além disso, com ponto de corte menor observou-se maior sensibilidade para esta prova quando comparada a RIFI, o que a torna recomendável, principalmente para inquéritos soroepidemiológicos, pela necessidade de se realizar uma triagem rápida, muitas vezes de grande número de animais.

Aliado aos fatores já elencados, a baixa especificidade da DAT no presente estudo, pode estar relacionada à presença de reações cruzadas com outros parasitas, e também a limitada especificidade da DAT em animais assintomáticos, fato ressaltado por Mohammadiha et al.¹⁰⁸. Este aspecto deve ser considerado pois sabe-se que na LVC há um grande percentual de animais assintomáticos e que podem ser sorologicamente positivos.

O teste de ELISA S7 utilizado no presente estudo, mostrou-se eficiente, entretanto, há poucos estudos, principalmente no Estado de São Paulo, empregando-se este kit. Tanto a especificidade e sensibilidade foram altas, mesmo desconsiderando-se os animais inconclusivos.

Em estudo realizado na região de Rio Verde- Goiás utilizando o ELISA S7, em 263 cães, 70 (26,62%) foram positivos e 35 (13,30%) permaneceram na faixa cinza¹⁰⁹. No presente estudo a porcentagem de animais inconclusivos foi de 9,83% (12/122), sendo que 7 (58,33%) foram negativos na RIFI e positivos na DAT, 4 (33,33%) positivos em ambas, e somente um (8,33%) negativo nas duas provas sorológicas, quando comparados ao ELISA.

Em contrapartida, Azevedo et al.¹¹⁰ observaram prevalência de 7,8% na cidade de Poxoréo-MT, e resultados ainda inferiores foram encontrados por Barbosa et al.¹¹¹ em Salvador – BA, Batista¹¹² em Caicó – RN, Alves et al.⁵² Fortaleza – CE, que obtiveram 0,7%, 5,02% e 1,59%, de positividade respectivamente, utilizando o ELISA S7.

O ELISA S7 é um teste novo no mercado, entretanto ao se comparar os valores de sensibilidade e especificidade obtidos no presente estudo com os citados na literatura, também utilizando antígenos recombinantes, como o RK39⁴¹, ele não se mostrou inferior, podendo-se recomendar a sua utilização como teste diagnóstico para LVC.

Ao se avaliar as provas sorológicas, pode-se, portanto afirmar que uma das maiores dificuldades na execução de métodos diagnósticos para LVC se baseia no fato de que não há um prova padrão-ouro que possa ser considerada extremamente confiável para a comparação entre as técnicas¹¹³. Além disso a grande maioria destes testes apresentam problemas de reação-cruzada com outros antígenos, principalmente no caso da RIFI^{114,57}, diminuindo assim a especificidade dos testes. Nesse sentido sugere-se que no diagnóstico de LVC, deve haver associação de várias técnicas disponíveis¹⁰². Este aspecto é mais importante ainda quando está em jogo o destino do animal, como por exemplo a indicação de eutanásia.

No presente estudo, na PCR gênero-específica utilizou-se primers que amplificavam o espaço de transcrição interna (ITS1-PCR) do DNA ribossomal, dos genes SSU e 5.8S rRNA, de acordo com El Tai et al⁹⁵. Esta prova mostrou melhor resultado para medula óssea, com positividade de 70,1%, enquanto que para linfonodo e sangue foi de 62,2% e 34,15% respectivamente. A menor positividade para o sangue, pode ser explicada pela menor carga parasitária circulante, as vezes insuficiente para ser detectada¹¹⁵. Ressalta-se ainda a degradação do DNA, seja pela excesso de hemoglobina interferindo na atuação da taq polimerase, ou pelo armazenamento inadequado da amostra.⁸⁰

Schonian et al.¹¹⁶ obtiveram em torno de 64% de positividade em amostras de medula óssea de cães, resultado pouco inferior ao obtido no presente estudo que foi de 70,1%.

Por outro lado, Srivastava et al.¹¹⁷ observaram que a positividade na medula óssea, utilizando a ITS1-PCR foi significativamente maior comparando-se a com a kDNA PCR, corroborando com os resultados de Reithinger et al.¹¹⁸ que mostraram que a região ssUDNA-PCR, conhecida por amplificar várias partes do gene 18rRNA em todas as espécies de *Leishmania*, é altamente eficiente no diagnóstico da LVC.

A sensibilidade observada pela ITS1- PCR comparada à RIFI, foi de 46,42% para o sangue, 76,78% para linfonodo e 86,60% para medula óssea. A baixa sensibilidade nas amostras de sangue, indica que este teste não é adequado para triagem em inquéritos epidemiológicos, pela baixa capacidade de detectar os verdadeiros positivos. A especificidade, para o sangue foi de 92,31% no sangue, para linfonodo de 73,08% e medula óssea de 65,38%.

Em estudo realizado por Mohammadiha et al.¹⁰⁸, com amostras de sangue e utilizando a ITS1-PCR, em comparação com a DAT, a sensibilidade e especificidade foi em torno de 72,2% e 89,3%. A sensibilidade no presente estudo quando comparada a RIFI, entretanto foi inferior, em torno de 46,42%. Os autores citados observaram ainda que ao utilizar o primer kDNA, tanto a sensibilidade como a especificidade foram superiores ao ITS1-PCR. Entretanto, a grande vantagem, da utilização do ITS1-PCR é que o produto amplificado é similar entre todas as espécies de *Leishmania* e os sítios específicos de restrição identificam regiões dos complexo *L. donovani* e *L. braziliensis*, fato não observado para o kDNA PCR.¹¹⁹

Troncarelli et al.³⁷ ao analisarem amostras de fígado e baço para *Leishmania* spp. em cães do município de Bauru, obtiveram 100% de acurácia no teste. Enquanto valores inferiores foram observados por Troncarelli et al.⁹⁸ ao avaliarem cães da mesma região, obtendo 76% e 72% de positividade para a PCR, em amostras de fígado e baço respectivamente, utilizando-se o protocolo LINR4 e LIN19. É importante ressaltar que estes resultados, apesar de não serem provenientes da análise dos mesmos materiais utilizados no presente estudo, evidenciaram a eficácia da PCR na região em comum estudada. confirmando, portanto, que a sensibilidade dos métodos da PCR pode variar de acordo com o tipo de técnica utilizada e com a amostra biológica examinada¹²⁰. É válido acrescentar também que a PCR utilizando o protocolo com os *primers* LINR4 e LIN19 foi utilizada neste estudo, entretanto, após a realização do sequenciamento obteve-se como resultado osequencias semelhantes ao DNA de cão, ou seja este *primer* não apresentou-se específico para *Leishmania* spp. no para esta espécie animal, por isso, optou-se por utilizar do protocolo ITS1-PCR.

A positividade somente após a NESTED-PCR foi observada em 12 amostras de sangue, 13 de linfonodo e quatro de medula óssea. Sreenivas et al.⁸¹ demonstraram em seus estudos, que a sensibilidade da NESTED é maior

do que a PCR primária, permitindo assim resultados ainda mais confiáveis. Corroborando com os dados de Schonian et al. ⁷⁷, ao utilizarem o protocolo de nested ITS1-PCR em amostras humanas e de cães, associadas a comparação entre dois ensaios de PCR, mostrando maior sensibilidade para PCR-ITS1, quando realizada a nested das amostras.

A quantificação da carga parasitária foi de extrema importância no presente estudo, para a comparação entre o limiar de detecção com a PCR para *Leishmania chagasi*. A avaliação da correlação entre estas duas provas, mostrou sensibilidade e especificidade elevadas em todos os materiais analisados. Para linfonodo e medula óssea a especificidade foi de 100%, indicando excelente capacidade de detecção de verdadeiros negativos.

A qPCR oferece rápida identificação e quantificação das espécies de *Leishmania* a um nível mais complexo, sendo uma ferramenta molecular que pode auxiliar tanto na epidemiologia quanto na clínica ¹⁶. Pelo fato de permitir a quantificação do parasita, pode auxiliar na confirmação do diagnóstico da LVC nos casos em que a sorologia é inconclusiva, seja por estes animais ainda não apresentarem níveis suficientes de anticorpos detectáveis, ou mesmo nos casos de anergia. ⁷⁶

A complexidade, o tempo de realização e custo das técnicas moleculares no geral, principalmente no caso da qPCR, restringem a utilização destas técnicas a campo ¹⁶. A sua viabilidade, em pesquisas científicas, por outro lado, é extremamente adequada, como visto no presente estudo, onde a especificidade da prova para dois tipos de amostras foi de 100%, superior aos resultados obtidos nas provas sorológicas bem como na PCR convencional.

O objetivo maior do presente estudo foi, entretanto, caracterizar as espécies de *Leishmania* presentes na região de Bauru. Desta forma, a utilização de duas abordagens de PCR foi extremamente importante, pois num primeiro momento, a PCR para gênero selecionou todas as amostras positivas, enquanto a PCR para *Leishmania chagasi* indicou quais amostras deveriam ser caracterizadas e sequenciadas afim de se chegar na espécie responsável pela doença animal.

Sabe-se que diferentes espécies de *Leishmania* podem ocasionar a enfermidade, algumas inclusive coexistindo em uma mesma região. Desta forma

a distinção das espécies é importante ¹²¹. Em áreas não-endêmicas, onde qualquer espécie de *Leishmania* pode ser importada, e em áreas endêmicas onde mais de uma espécie pode ser encontrada, ferramentas diagnósticas são requeridas, a detecção do parasita em amostras clínicas e a utilização de protocolos diagnósticos para distinguir todas as espécies relevantes são extremamente importantes.

Muitos estudos epidemiológicos sobre leishmaniose tem utilizado a abordagem de PCR-RFLP, por meio da análise, por exemplo, dos espaços intergênicos do operon ribossomal ^{122,116} e do minicírculo do kinetoplasto ^{123,124,125,126,79}. Estas abordagens são consideradas simples e rápidas, podendo ser usadas diretamente em isolados do agente.¹²⁴

Estudos mostram que a identificação de espécies pela PCR seguida da RFLP, hibridização ou sequenciamento se apresentam como métodos menos laboriosos e onerosos, em relação a utilização de outras técnicas. ⁸²

A vantagem de se utilizar a ITS1 –PCR é a digestão do amplicon com apenas uma enzima de restrição (HAE III), sendo suficiente para distinguir todas as espécies de *leishmanias* de relevância médica, somente dificultando a identificação da espécie *L.aethiopica*, problema que pode ser resolvido com a utilização de outra enzima de restrição, a Cfol.⁸⁶

O perfil genotípico encontrado com a RFLP- ITS1 mostrou que das 20 amostras analisadas, todas pertenciam ao complexo *L.donovani* (*L.infantum*, *L.donovani* e *L.chagasi*). O fato das espécies pertencentes a este complexo serem caracterizadas como viscero-trópicas, elucidam informações a respeito da forma da doença principalmente encontrada nos animais daquela região, associando-se ao importante potencial zoonótico.

A ausência de estudos em Bauru, justifica e reafirma a importância do presente estudo, pois o esclarecimento com relação as espécies predominantes é importante no direcionamento de medidas de controle mais adequadas, de eliminação dos reservatórios positivos e de adequação de técnicas diagnósticas. Além disso, estas informações poderão ser utilizadas em novos estudos que vierem a ser realizados, de modo a possibilitar o acompanhamento das alterações no perfil genotípico desta região ao longo do tempo.

O sequenciamento foi importante pois possibilitou análise das sequências presentes nas amostras caracterizadas pela RFLP, comparando-as com as já

existentes no GenBank. A análise mostrou que todas as amostras possuíam sequências semelhantes, em torno de 100%, com as espécies *L.chagasi*, *L.infantum* e *L.donovani*.

As espécies encontradas tanto na RFLP como no sequenciamento foram as mesmas, caracterizando-se como pertencentes a espécies do complexo *L.donovani*.

Considerações Finais

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A DAT e ELISA mostraram alta sensibilidade frente a RIFI, sendo importantes alternativas para a utilização em inquéritos epidemiológicos, considerando-se a praticidade, tempo de realização, mão-de-obra e reagentes utilizados.
- A DAT não detectou efetivamente os verdadeiros negativos, apresentando baixa especificidade, indicando que o seu uso, seria mais fidedigno se associado a uma outra prova, como o ELISA.
- A qPCR mostrou-se muito eficiente nos três tipos de amostras analisadas. A especificidade chegou a 100% para linfonodo e medula óssea. Apesar da alta sensibilidade e especificidade, esta técnica ainda é onerosa, para utilização em inquéritos epidemiológicos.
- A correlação entre a PCR e qPCR foi alta para todos os tecidos, mostrando consenso nos resultados entre as duas provas.
- A caracterização e sequenciamento das amostras positivas para gênero e negativas para *L.chagasi* foi relevante para o esclarecimento das possíveis espécies de *Leishmania* envolvidas no surto da LVC na região de Bauru.
- O perfil genotípico presente na região revelou que todos os animais analisados apresentavam LVC por espécies pertencentes ao complexo *L.donovani*, e portanto, causadores da forma visceral da doença.
- O entendimento sobre o perfil genotípico pode influenciar diretamente nas medidas de eliminação desses animais doentes, assim como no esclarecimento de informações para estudos posteriores.

Referências

8. REFERÊNCIAS

1. WHO. Report of meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniasis- Geneva, Switzerland:Control of leishmaniasis. 2010.
2. Sonoda MC, Rossi CN, Laurenti MD, Larsson CE. Estudo retrospectivo de casos caninos de leishmaniose atendidos na cidade de São Paulo, Brasil(1997-2007).Semina Cienc Agrarias.2013;34:741-758.
3. Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania spp* in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Díptera *Psychodidae: Phlebotominae*).Rev do Inst de Med Trop de São Paulo.2002; 44:255-259.
4. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis:what are the needs for diagnosis, treatment and control. Nat. Rev. Microbiol.2007; 5:873-882.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília. 2006 ; 9-18.
6. Alonso DP. Utilização de marcadores moleculares no estudo populacional de *Leishmania infantum chagasi* no Brasil. Botucatu. Tese [Doutorado em Ciências Biológicas- Genética]. Universidade Paulista-Campus de Botucatu;2011.
7. Monteiro EM, Silva JCF, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, Coelho GLLM, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES. Visceral leishmaniasis: a study on phlebotomine sand flies and canine infection in Montes Claros, State of Minas Gerais. Rev Soc Brasil Med Trop.2005; 38(2):147-152.

8. Dantas-Torres F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2006; 101:117–118.
9. Werneck GL. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 2010; 26(4):644-645.
10. Slappendel RJ. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. *Vet Quarterly*. 1988; 10:1-16.
11. Miller WH, Griffin CE, Campbell KL. Viral, rickettsial and protozoal skin diseases. In: *Kirks small animal dermatology*, 7ed. Missouri. Elsevier. 2013; 354-357.
12. Langoni H. Zoonoses and human beings. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2004; 10 (2):111.
13. Marzochi MCA, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009; 42(5):570-580.
14. Bern C, Maguire JH. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *Plos Negl. Trop. Dis*. 2008; 2:313.
15. Coura JR. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005.
16. Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res*. 2012; 110:1065-1078.
17. Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*. 2000; 16:188–189.

18. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perires J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et compare*. 1990; 65:111–125.
19. Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Mrtinidumas A, Serres E. Phylogenetic Taxonomy of New World *Leishmania*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 1993^a; 68 (2):104-106.
20. Kuhls K, Chicharro C, Cañavate C, Cortes S, Campino L. Differentiation and Gene Flow among European Populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2: e261.
21. Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA, Schonian G. Comparative Microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old worl origin. *Plos Negl Trop Dis*. 2011; 5: e1155.
22. WHO. First WHO report on neglect tropical diseasis: working to overcome the global impact of neglected tropical diseasis. 2010
23. Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest*. 2008; 118:1301–1310.
24. Haralambous C, Antoniou M, Pratlong F, Dedet JP, Soteriadou K. Development of a molecular assay specific for the *Leishmania donovani* complex that discriminates *L. donovani/Leishmania infantum* zymodemes: a useful tool for typing MON-1. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2008; 60(1):33-42.
25. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Biology and Epidemiology. London: Academic Press. 1987; 1: 1-120.

26. Dedet JP, Dereure J, Vanwambeke SO, Malé P, Martinez S, Pratlong F, Balard Y. The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in southern France. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009; 9(6):687-94.
27. Madeira A. <http://www.saude.rs.gov.br/dados/1239906534180> Programa de Vigilância e Controle.pdf. 2009.
28. BEPA. Comitê de Leishmaniose Visceral Americana da Secretaria do Estado de São Paulo: Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo. 2008;8(96):32-36
29. CVE. http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_lpi.htm. Distribuição do número de casos e óbitos de LVA segundo município e GVE de infecção, Estado de São Paulo, 2010 a 2013. Acesso: 20 novembro de 2013.
30. Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004; 57:1-87.
31. Machado PR, Ampueiro J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Sousa RS, Talhari A, Penna G, Carvalho EM. Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A Randomized and Controlled Trial. *Plos Negl Trop Diseases.* 2010; 4(12): 912.
32. Silva SM, Rabelo PFB, Gontijo NF, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, Michalick MSM. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Vet. Parasitol.* 2010.
33. Rossi CN. Occurrence of *Leishmania* sp. in cats Araçatuba City, São Paulo state, Brazil. Dissertation presented at the School of Agricultural and Veterinarian Sciences, UNESP Campus of Jaboticabal, as part of

- requirements for obtaining the Masters in Veterinary Medicine. Clin Vet Medicine. 2007.
34. Costa TAC, Rossi CN, Laurenti MD, Gomes AAD, Vides JP, Sobrinho LSV, Marcondes M. Occurrence of leishmaniosis in cats of an endemic area for visceral leishmaniosis. Braz. J. Vet. Anim. Sci. 2010; 47: 213–217.
 35. Vides JP, Schwardt TF, Sobrinho LSV, Laurenti MD, Biondo AW, Lteneggerer C, Marcondes M. *Leishmania chagasi* infection in cats dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. Vet. Parasit. 2011; 22-28.
 36. Palatnick SCB, Santos WR, França-Silva JC, Costa RT, Barbosa RA, Palatnick M. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2001; 65:510.
 37. Troncarelli MZ, Lucheis SB, Camargo JB, Machado JG, Langoni H. Análise clínica e laboratorial em cães eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses de Bauru-SP, com vistas ao diagnóstico de leishmaniose visceral(LV). Vet e Zootec. 2009; 343-352.
 38. Moreira MAB, Luvizotto MCR, Garcia JF, Corbet, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniosis in dogs with different clinical signs. Vet Parasitol. 2007;145:245-252.
 39. Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo. Clín. Vet..2000;28:36-44.
 40. Harhay MO, Olliaro PLC, Costa CH. Urban parasitology visceral leishmaniasis in Brazil. Trends Parasitol. 2011; 27:403-409.
 41. Maia-Elkhoury NA, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. Cad. Saude publica. 2008; 24:2941-2947.

42. Barreto M. Pesquisa de leishmania por meio de reação em cadeia da polimerase e identificação de espécies da subfamília phlebotominae (diptera: psychodidae) em áreas de ocorrência da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. (Dissertação). Brasília: Universidade de Brasília;2011.
43. Bepa. Boletim Epidemiológico Paulista. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo, atualizado em maio de 2010. São Paulo.2010; 7:21-40.
44. Gontijo CMF; Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Vet. Bras. Epidemiol. 2004;7:338-349.
45. Queiroz NM, Assis J, Oliveira TM, Machado RZ, Nunes CM, Strake-Buzetti WA. Canine visceral leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with IFAT and ELISA test. Rev Bras Parasitol Vet. 2010; 19:32-8.
46. Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment and a proposed research and development agenda. Lancet Infect Dis.2002; 2: 494-501.
47. Davies CR, Kaye P, Croft SL. & Sundar, S. - Leishmaniasis: new approaches to disease control. Brit. med. J., 326: 377-382, 2003.
48. Faria AR, Andrade HM. Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. Ver Pan-Amaz Saude.2012;3(2):47-57.
49. Bepa. Boletim Epidemiológico Paulista(online). Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral canina. São Paulo. 2009;6:67.

50. Maia C, Ramada J, Cristovão J, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J.* 2009; 179:142-4.
51. Gomes YM, Cavalcanti MP, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J.* 2008;175(1):45-52.
52. Alves AL, Bevilaqua CML, Moraes NB, Franco SO. Levantamento epidemiológico da leishmaniose visceral em cães vadios da cidade de Fortaleza, Ceará. *Ciência Animal.* 1998;8(2): 63-68.
53. Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AGP, Silva ED, Abath FGC, Alves LC, Souza WV, Gomes YM. Canine visceral leishmaniasis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet. Parasitol.* 2006; 137:11-16.
54. Almeida MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet. Parasitol.* 1996; 127, 227-232.
55. Luciano RM, Lucheis SB, Troncarelli 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). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2009;46:181-187.
56. Romero GA, Boelaert M. Controle de visceral leishmaniasis in Latin America—a systematic review. *Plos Negl, Trop. Dis.* 2010; 4:584.
57. Reis MM. Testes imunológicos: manual ilustrado para profissionais da saúde. Porto Alegre: Senac; 1999.

58. Mohebbali M, Edrissian GH, Shirzadi MR, Akhoundi B, Hajjaran H, Zarei Z. Na obseration study on the current distribution of visceral leishmaniasis in different geographical zones of Iran an implication to health policy. *Travel. Med. Infect. Dis*;2011 ;9(2):67-74.
59. Chappuis F, Rijal S, Singh R, Acharya P, Karki BM, Das ML, et al. Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigenbased dipstick test for the diagnosis of suspected Kalaazar in Nepal. *Trop Med Int Health*.2003;8(3):277-85.
60. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971;8(9):871–874.
61. Brasil. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília. 2003;120p.
62. Palatnick-de-Souza CB, Gomes EM, Paraguai-de-Souza E, Palatnik M, Luz K, Borojevic R. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*.1995; 89:390-3.
63. Carvalho FA, Charest H, Tavares CAP, Matlashewskif G, Valente EP, Rabello A, et al. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn Microbiol Infect Dis*.2002; 43(4):289-95.
64. Biogene. Kit para diagnóstico do Calazar Canino (online). Recife, 2007. (Capturado em 20 de fevereiro de 2013) Disponível em <http://biogene.ind.br/idex.php?pag=produtos>.
65. Aguiar DM, Oliveira TMFS, Cavalcanti GT, Labruna MB, Camargo LMA, Machado RZ. Seroprevalence of anti-*Leishmania* spp. Antibodies in rural

- dogs from the city of Monte Negro, State of Rondônia, Brazil. *Rev Bras Parasitol.* 2010;19(1):71-72.
66. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC). 2011
67. Bisugo MC Araújo MFL, Taniguchi HH, Acunha E, Santos AA, Pessoto-Junior M, Kaneto CN, Camargo C, Polizel MA, Vigilato MAN, Negreiros CMS, Okanima M, Gonçalves NM, Lunstedt LP, Andrede AM, Lima MA, Tolezano J. E. 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; 66(2): 185-193.
68. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2nd ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.
69. Laurenti MD. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. *Bepa* 2009;6(67):13-23.
70. Sundar S, Pai K, Sahu M. Immunochromatographic strip test detection of anti K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 96: 19-23.
71. Manna L, Vitali F, Reale S, Caracappa S, Panove LM, Morte RD, Cringoli G, Staaiano N, Gravino AE. Comparison of different tissue sampling for PCR- based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2004; 125: 251-262
72. Ikeda Garia FA, Feitosa MM. Métodos de diagnóstico de leishmaniose visceral canina. *Clin. Vet.* 2006.62:32-38.
73. Rosypal AC, Cortes-Vecino JA, Gennari SM, Dubey JP, Tidewell RR, Lindsay DS. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma*

- cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. Vet. Parasitol. 2007; 149: 172-177.
74. 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: 5249-5255.
75. Verma S, Kumar R, Katara GK, Singh LC, Negi NS, Ramesh V, Salotra P. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. Plos One. 2010; 5:100-107.
76. Cortes S. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani*. I. - specific kinetoplastid primers. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2004; 98(1):12-17.
77. Schonian G, Kuhls K, Mauricio I L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. Vet Parasitol. 2010; 16:1-21.
78. Toledo A, Martín-Sánchez J, Pesson B, Sanchiz-Marín C, Morillas-Marquez F. Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. Mol Biochem Parasitol. 2002; 257-264.
79. Laurent T, Rijal, S, Yardley V, Croft S, De Doncker S, Decuypere S, Khanal B, Singh R, Schönian G, Kuhls K, Chappuis F, Dujardin. Epidemiological dynamics of antimonial resistance in *Leishmania donovani*: Genotyping reveals a polyclonal population structure among naturally resistant clinical isolates from Nepal. Inf. Gen. Evol, 2007; 7: 206-212.
80. Lewin S, Schönian G, Tai NE, Oskam L, Bastien P, Presber W. Strain typing in *Leishmania donovani* by using sequence-confirmed amplified region analysis. Int J Parasitol. 2002; 32: 1267-1276.

81. Sreenivas G, Raju BVS, Singh R, Selvapandiyan A, Duncan R, Sarkar D, Nakhasi HL, Salotra P. DNA Polymorphism assay distinguishes isolates of *Leishmania donovani* that cause kala-Azar from those that cause post-kala-azar dermal leishmaniasis in humans. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:1739-1741.
82. Jamjoom MB, Ashford RW, Bates PA, Kemp SJ, Noyes HA. Towards a standard battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex. *Ann Trop Med Parasitol.* 2002; 96: 265-270.
83. Schwenkenbecher JM, Fröhlich C, Gehre F, Schnur LF, Schönian G. Evolution and conservation of microsatellite markers for *Leishmania tropica*. *Inf Gen Evol.* 2004; 4:99-105.
84. Ochsenreither S, Kuhls K, Schaar M, Presber W, Schönian G. Multilocus Microsatellite Typing as a New Tool for Discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 Strains. *J Clin Microbiol.* 2006; 44 (2): 495-50.
85. Kuhls K, Keilonat L, Ochsenreither S, Schaar M, Schweynoch C, Presber W, Schönian G. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes Infect.* 2007; 9: 334-343.
86. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, Jaffe CL. Pcr diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diag. Microb and Infect Disease.* 2003; 47:349-358.
87. Grimaldi Jr. The utility of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and other non-human primate models for preclinical testing of *Leishmania* candidate vaccines: A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 1995; 103(7): 629-644, 1995.

88. Chappuis F, Mueller Y, Nguimfack A, Rwakimari JB, Couffignal S. Diagnostic accuracy of two rK39 antigen-based dipsticks and the formol gel test for rapid diagnosis of visceral leishmaniasis in northeastern Uganda. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5973–7.
89. Anon, 2006. (Capturado em 20 de setembro de 2013. Disponível em: www.bauru.sp.gov.br/dadosgeograficos).
90. Center for Disease Control and Prevention. Epi Info 2002. Atlanta: CDC; 2004. (Capturado em 06/06/2012) Disponível: <http://www.cdc.gov//epiinfo.htm>.
91. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades @. IBGE [Internet]. 2007. (Capturado em 06/06/2012) Disponível: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/>.
92. Secretaria Municipal de Saúde de Bauru, SMS. População canina estimativa da região. 2011
93. Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Int. Med. Trop.* 1966; 8: 227-234.
94. Garcez LM, Silveira FT, Harith A, Lainson R, Shaw JJ. Experimental cutaneous leishmaniasis IV. The humoral response of *Cebus apella* (Primates: Cebidae) to infections of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Vianna) lainsoni* and *L. (V.) brazilienses* using the direct agglutination test. *Acta Tropica.* 1997; 68: 65-76.
95. El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schonian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2000; 94(5):575-579.

96. Mackinnon A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. *Comput. Biol. Med.* 2000;30(3):127-134.
97. Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AS. *BioEstat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.* Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. 2007; 364p.
98. Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H. *Leishmania spp and/or Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic áreas for canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasit.* 2009;164:118-12.
99. Missawa NA, Dias ES. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:913–918.
100. Savani ES, Nunes VL, Galati EA, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter- Winter LM. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania spp.* in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Vet Parasitol.* 2009; 160:18–24.
101. Rami M, Atarhouch T, Sabri M, Cadi SM, Benazzou T, Dakkak A. Canine leishmaniasis in the Rif mountains (Moroccan Mediterranean coast): a seroepidemiological survey. *Parasite.* 2003; 10:79-85.
102. Camargo JB, Langoni H, Troncarelli MZ, Machado JG, Lucheis SB, Padovani CR. Performance of IFAT, ELISA, direct parasitological examination and PCR on lymph node aspirates for canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Journ Ven Anim Tox including Trop Diseases.* 2010; 16(3): 414-420.

103. Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, Schallig H, Gontijo CMF. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. 2007; 146: 235-241. Rev Soc Bras M. 1996;29:165-80.
104. Da Silva ES, Van Der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CM, Schallig HD, Brazil RP. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic área of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. Vet Res Commun. 2006;30:637-43.
105. Terán-Angel G, Schallig H, Zerpa O, Rodríguez V, Ulrich M, Cabrera M. The direct agglutination test as an alternative method for the diagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. 2007;27:447-53.
106. Garcez LM, Shaw JJ, Silveira FT. Teste de aglutinação direta no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral no estado do Pará. Rev Soc Bras Med Trop. 1996;29(2):165-80.
107. Mohebbali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, Akhoundi B, Manouchehri Naeini K, Avizeh R, Fakhar M. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. Vet Parasitol. 2005, 129(3-4):243-251.
108. Mohammadiha A, Haghghi A, Mohebbali M, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, Yeganeh F, Kazemi B, Taghipour N, Akhoundi B, Barati M, Mahmoudi MR. Canine visceral leishmaniasis: A comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. Vet Parasit. 2013;192:83-90.
109. Ednea FPS. Inquérito sorológico de leishmaniose canina na cidade de Rio Verde-GO. Dissertação apresentada ao Programa Multiinstitucional de Pós-Graduação em Ciência da Saúde. Universidade de Rio Verde, Campo Grande, Brasil. 2007.54p.

110. Azevedo MAA, Dias AKK, Paula HB, Perri, SHV, Nunes CM. Avaliação da leishmaniose visceral canina em Poxoréo, Estado do Mato Grosso, Brasil. Rev Bras Parasit Vet. 2008; 17 (3): 123-127.
111. Barboza DCPM, Leal DC, Souza BMPS, Carneiro AJB, Gomes Neto CMB, Alcantâra ACD, Julião FS, Moura SAB, Peralva LMP, Ferreira F, Franke CR. Inquérito epidemiológico da leishmaniose visceral canina em três distritos sanitários do Município de Salvador, Bahia, Brasil. Revi Bras Sau Prod Ani.2009;10(2):434-447.
112. Batista MGN. Levantamento de leishmaniose visceral no município de Caicó, Rio Grande do Norte, Brasil: soroprevalência de risco e isolamento do agente. Monografia do Curso de Especialização. Saúde Pública Veterinária. Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB, Brasil, 2008. 51.
113. Boelart M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Karki B, Jacquet D, Chappuis F, Campino L, Desjeux P, Le Ray D, Koirala S, Van der Stuyft P. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. Am J. Trop. Med. Hyg. 2004;70:72-77.
114. Boelart M, Safi EL, Jacquet D, Muynck A, Stuyft PV, Ray D. Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis. Am J. Trop. Med Hyg. 1999;60:126-134.
115. Fisa R, Rieira C, Gallego M, Manubens J, Portus M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. Vet Parasitol. 2001;99:105-111.
116. Schonian G, Schnur L, El Fari M, Oskam L, Kolesnikov A, Sokolowska-Kohler W, Presber W. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. Trans Royal Soc Trop Med Hyg. 2001;95:217-224.
117. Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. Trans Royal Soc Trop Med Hyg.2011;1051-6.

118. 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;38:748-751.
119. Van Eys GJJM, Schoone GJ, Kroon NCM, & Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. Mol Biochem Parasitol. 1992;51:133-142.
120. Leite RS, Ferreira SA, Ituassu LT, Melo Mn, Andrade AS. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. Vet Parasit. 2010;15:806-10.
121. Toz SO, Culha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Alkan AZ. A real time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human na dog clinical samples in Turkey. Neg Trop Diseases. 2013;7:1-7.
122. Cupolitto E, Grimaldi G Jr, Momen H & Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. Mol Bioch Parasit. 199;73:145-155.
123. Noyes HA, Reyburn H, Bailey 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. Jour Clin Microb. 1998;36:2877-2881.
124. Morales MA, Cruz I, Rubio JM, Chicarro C, Canavate C, Laguna F, Alvar J. Relapses versus reinfections in patients coinfectd with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. Jour Infect Diseas. 2002;185:1533-1537.

125. Chicharro C, Morales MA, Serra T, Ares M, Salas A & Alvar J. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island. Of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. *Trans Royal Soc trop Med Hyg.* 2002;1:93-99.
126. Cortes S, Mauricio I, Almeida A, Cristovão JM, Pratlong F, Dedet JP & Campino L. Application of KDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitol Intern.* 2006;55:277-283.