

**FABIO ANTONIO COLOMBO**

**Detecção de RNA de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em pulgas e carrapatos coletados de cães naturalmente infectados e padronização de uma PCR em tempo real para diagnóstico e diferenciação de espécies de *Leishmania***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública**

**Orientador: Profa. Dra. Vera Lúcia Pereira Chioccola**

**São Paulo  
2012**

### FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Colombo, Fabio Antonio

Detecção de RNA de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em pulgas e carrapatos coletados de cães naturalmente infectados e padronização de uma PCR em tempo real para diagnóstico e diferenciação de espécies de *Leishmania* / Fabio Antonio Colombo - São Paulo, 2012.

Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Vera Lúcia Pereira-Chioccola

1. Leishmaniose visceral    2. Artrópodes    3. Reação em cadeia de polimerase em tempo real    4. RNA mensageiro

SES/CCD/CD-254/11

## **Dedicatória**

Dedico esse trabalho aos meus pais Antônio e Darlete, ao meu irmão Luiz, pelo apoio em todas as horas e por entenderem os momentos de ausência. Dedico a minha esposa Simone, pelo incentivo, paciência e por ficar sempre ao meu lado. Dedico ainda esse trabalho aos cães que foram sacrificados para que eu pudesse de alguma forma trabalhar para contribuir na qualidade de vida dos humanos e dos cães. Aos animais, respeito e agradecimento.

“O nitrogênio do nosso DNA, o cálcio dos nossos dentes, o ferro no nosso sangue, o carbono nas nossas tortas de maçã foram feitos no interior de estrelas em colapso.

Nós somos feitos de poeira das estrelas.”

Carl Sagan

## Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora **Dra. Vera Lucia Pereira-Chioccola** pelos ensinamentos, companheirismo e pela confiança no meu trabalho. Agradeço ainda por ela me deixar livre para eu tomar as minhas decisões durante o trabalho, permitindo que eu aprendesse com meus próprios erros.

À **Dra. Rosa Maria Ferreira Noguerol Odorizzi**, pelo auxílio na coleta dos ectoparasitas e estudo taxonômico. Foi onde tudo começou.

À **Dra. Márcia Dalastra Laurenti**, pela realização dos testes de ELISA.

Agradeço a toda a equipe da Genoa Biotecnologia, principalmente ao **Dr. Flávio Canavez, Geisly, Márcia e Alberto**, pelos ensinamentos no desenho dos primers e na extração de RNA.

Ao **Dr. José Rodrigues Gonçalves Neto** e toda equipe do **Centro de Controle de Zoonoses de Bauru**, principalmente à **Cláudia, Luíz, Mario, Donizete, Roberto e Ademilson**, por permitirem que eu acompanhasse a rotina do programa de controle da LVA.

Ao **Dr. Jose Eduardo Tolezano, Dr. Roberto Hiramoto, Dra Helena Taniguchi** e toda equipe de campo do Instituto Adolfo Lutz, **Carlos Elias, Ruy Larosa, Jose Augusto e Jose Eduardo**, por me ajudarem na coleta e pesquisa de campo.

Ao **Dr. Cláudio Tavares Sacchi** e toda equipe, especialmente a **Gisele, Fábio, Lucila, Maristela e Priscila**, por me auxiliarem nas reações da PCR em tempo real.

Agradeço ao **CDC**, em especial ao **Alexandre da Silva, Marcos “Johnny”, Patty Wilkins, Becky, Yvonne, Frank, Henry, Blaine e Maniphet**, pela oportunidade, paciência e por se esforçarem para entender meu inglês, e aos amigos que encontrei por lá, **Keith, Lisa “Bon Jovi”,**

**Sukwan e Janine.** Além da **Dra. Alessandra Morassutti, Veronika Schmidt** e **Eliane Suzuki**, companheiras de laboratório, de café e prosa.

À **Profa. Dra. Hiro Goto** (IMT-SP), ao **Prof. Dr. José Angelo Lauletta Lindoso** (IMT-SP), e ao **Prof. Dr. Cláudio Casanova** (Sucen), , a **Profa. Dra. Marcia Dalastra Laurenti** (FM-USP), a **Profa. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati** (FSP-USP), integrantes das banca de qualificação e defesa, pelas sugestões oferecidas para o enriquecimento deste trabalho.

À **Juliana Quero Reimão** e ao **Dr. André Gustavo Tempone**, pela colaboração que nos rendeu muitos frutos.

As amigas **Cristina da Silva Meira, Gabriela Motoie, Isabelle Martins Ribeiro Ferreira e Thais Alves da Costa Silva** por todos os momentos compartilhados nesses quase 10 anos de convivência e por todo incentivo e ajuda. Ainda sei que sempre posso contar com vocês.

Agradeço ainda aos amigos **Jefferson Sabino, Ricardo Dalla Zanna, Ricardo Gava, Lasaro Teixeira, Alexandre Pires, Dan Jessé, Sonia Ueda, Erika Pinto, Juliana Tonini, Kate Bastos, Tatiana Rodrigues, Inara Bastos, Ana Paula, Ligia Ferreira, Cida Perez e Margarete Pereira** pelos momentos de descontração e pela amizade.

As meninas **Talita Balczó, Estela Lourenço, Daiane, Natália Carvalho, Nailliw Preite e Daniela Adolfi**, por me obrigarem a estudar e relembrar conceitos já esquecidos.

A todos os pesquisadores científicos, biólogos, auxiliares e técnicos do Centro de Parasitologia e Micologia do 8º andar do Instituto Adolfo Lutz, que contribuíram direta e indiretamente em minha formação acadêmica, pela ajuda, amizade e compreensão.

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-2008/00520-6).

Fabio Antonio Colombo teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- 2008/57245-7).

## Resumo

A leishmaniose visceral americana (LVA) é um sério problema de saúde pública. No período de 2003 a 2009 foram registrados no Brasil mais de 34 mil casos de leishmaniose visceral. Até a década de 80, a maioria dos casos concentrava-se em áreas rurais dos municípios. Esse perfil mudou e vários casos são notificados nas áreas urbanas. No Estado de São Paulo a doença é autóctone desde 1998. A partir de 2003 foram registrados também casos autóctones caninos nas redondezas da região metropolitana de São Paulo. Uma das formas de se avaliar a propagação da infecção é o estudo dos transmissores. Embora *Lutzomyia longipalpis* seja uma espécie prevalente em zonas urbanas, tem sido a única responsável pela transmissão na área urbana dos municípios da região Oeste do Estado. Contudo, na Região Metropolitana de São Paulo a sua presença ainda não foi detectada. Este fenômeno leva a supor que outra espécie de flebotomíneos ou outros ectoparasitas de cães como os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e as pulgas *Ctenocephalides felis felis* possam estar envolvidos na transmissão da LVA.

Este estudo mostra que os cães estão densamente infestados por pulgas e carrapatos em todos os estádios evolutivos. Além disso, material genético positivo para *L. (L.) infantum chagasi*, foi encontrado no interior desses ectoparasitas com uma positividade variando de 53,1% nas pulgas a 77,7% nas ninfas, inclusive após a ecdise de ninfa para o estágio adulto sugerindo a capacidade dos carrapatos de preservar parasitas vivos. Com a utilização da PCR em tempo real, foi possível quantificar o DNA presente no interior dos ectoparasitas.

A PCR em tempo real single se mostrou eficiente na detecção de espécies do subgênero *Leishmania* e com a PCR multiplex foi possível diferenciar entre as espécies dos subgênero *Viannia* e as do complexo *donovani*. O marcador molecular (CY5) da PCR em tempo real multiplex foi capaz detectar todas as espécies de *Leishmania spp* analisadas sendo útil para detectar espécies de pouca circulação.

Carrapatos e pulgas podem estar cooperando para a disseminação da LVA em cães, principalmente devido a alta frequência de infestação e a alta prevalência de *L. (L.) infantum chagasi* viáveis nos ectoparasitas. Porém, com esses dados, não foi possível concluir se os ectoparasitas atuam como vetores necessitando de novos estudos.

Palavras chave: PCR Real Time, transmissão da leishmaniose visceral canina, vetores alternativos.

## Abstract

American visceral leishmaniasis (AVL) is a serious public health problem. Between 2003 to 2009 occurred more than 34 000 cases of visceral leishmaniasis in Brazil. Until the 80s most of the cases were found in rural areas. This profile has changed and several cases are reported in urban areas. In the State of Sao Paulo the disease is autochthonous since 1998. Since 2003 canine autochthonous cases were also reported in the vicinity of the metropolitan region of Sao Paulo. One way to assess the spread of infection is the study of the transmitters. Although *Lutzomyia longipalpis* is a species prevalent in urban areas, have been the one responsible for the transmission in the urban cities of the western region of the state. However, in the Metropolitan Region of São Paulo their presence has not yet been detected. This phenomenon leads to assume that other species of sand flies or other ectoparasites of dogs like brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* and the fleas *Ctenocephalides felis felis* may be involved in the transmission of AVL.

This study shows that dogs are heavily infested with ticks in all stages of evolution, and by fleas. And the positive DNA for *L. (L.) infantum chagasi* was found inside of these ectoparasites with positivity ranging from 53.1% in fleas to 77.7% in the nymphs. Even after nymphal ecdysis to the adult stage suggesting the ability of ticks to preserve live parasites. Using real-time PCR it was possible to quantify the DNA present in the interior of ectoparasites.

A single real-time PCR proved efficient in the detection of species of the subgenus *Leishmania* and the multiplex PCR was possible to differentiate between species of the subgenus *Viannia* and the *donovani* complex. The molecular marker (Cy5) of the multiplex real-time PCR was able to detect all species of *Leishmania spp* analyzed and is useful for detecting species of poor circulation.

Ticks and fleas can be cooperating for the dissemination of AVL in dogs, mainly due to the high rate of infection and high prevalence of viable *L.*

*(L.) infantum chagasi* in ectoparasites. With this data was not possible to conclude whether ectoparasites act as vectors requiring further studies.

Keywords: Real Time PCR, transmission of canine visceral leishmaniasis, alternative vectors.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**CDC** - "Centers for Disease Control and Prevention"

**cDNA** – DNA complementar

**DNA** - Ácido desoxirribonucléico

**EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra - acético

**ELISA** – "Enzyme-linked Immunosorbent Assay"

**g** - Aceleração da gravidade terrestre ( $9,8\text{m/s}^2$ )

**g** – grama(s)

**IFI** - Imunofluorescência indireta

**kDNA**- DNA do cinetoplasto

**LC**- Leishmaniose cutânea

**LCD**- Leishmaniose cutânea difusa

**LMC**- Leishmaniose muco cutânea

**LTA** – Leishmaniose tegumentar americana

**LV** – Leishmaniose visceral

**LVA** –Leishmaniose visceral americana

**mM** - milimolar

**mL** – mililitro(s)

**mg** – miligrama(s)

**OMS**- Organização Mundial da Saúde

**pH** – concentração de hidrogênio iônico

**PCR**- Reação em cadeia da polimerase

**pb** - Pares de base

**PBS** – Solução Salina Tamponada com Fosfato

**RNA** - Acido ribonucléico

**SFM** - sistema fagocítico mononuclear

**TBE** - Tris/ Borato/ EDTA

**UV** – Ultravioleta

**°C** - Graus centígrados

**μM** - Micromolar

**μl** – Microlitro

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

- Figura 1-** Ciclo evolutivo das leishmanioses.....20
- Figura 2-** Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA (1) e cDNA (2) extraídos de carrapatos fêmeas retirados de um mesmo cão com leishmaniose visceral.....53
- Figura 3 -** Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados de DNA de um pool de carrapatos fêmeas retirados de um cão infectado.....54
- Figura 4 -** Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados utilizando amostra de cDNA de pool de carrapatos adultos após a mudança de estádio.....55
- Figura 5 -** Quantificação das concentrações de cDNA de grupos de pulgas (F), carrapatos adultos fêmeas (AFT), carrapatos adultos machos (AMT), carrapatos ninfas (NT) e ninfas recente mudadas (MAT), em pg/ $\mu$ L..... 56
- Figura 6 -** Curva padrão obtida do log das diluições seriadas de DNA de *L. (L.) infantum chagasi* e seus respectivos valores de  $C_T$ .....57
- Figura 7 -** Padronização da PCR em tempo real com o marcador LinJ31 com amostras de DNA e cepas padrões com seus respectivos valores de  $C_T$ .....59
- Tabela 1 -** Marcadores moleculares de regiões específicas do mRNA de *L. (L.) infantum chagasi*.....43

**Tabela 2** - Frequência da infestação de pulgas e carrapatos encontrado nos cães com e sem leishmaniose provenientes da cidade de Mirandópolis.....50

**Tabela 3** - Prevalência de *L. (L.) infantum chagasi* em carrapatos e pulgas, retirados de cães com LVA.....51

**Quadro 1** - Distribuição dos resultados da PCR multiplex por número de isolados positivos em cada marcador molecular, CY-5, HEX e FAM.....61

# ÍNDICE

<b>1. Introdução.....</b>	<b>16</b>
1.1.Histórico.....	16
1.2. Taxonomia das leishmanias.....	17
1.3. Morfologia.....	18
1.4. Ciclo biológico das leishmanias.....	18
1.5. Epidemiologia.....	21
1.6. Leishmaniose tegumentar americana (LTA).....	22
1.7. Leishmaniose visceral.....	23
1.8. Principais hospedeiros vertebrados.....	25
1.9. Principais vetores.....	26
1.10. Vetores alternativos.....	27
1.11. Diagnóstico das leishmanioses.....	30
1.12. Métodos imunológicos.....	31
1.13. Métodos moleculares e caracterização de <i>Leishmania</i> .....	32
<b>2. Objetivo geral.....</b>	<b>34</b>
2.1. Objetivos específicos.....	34
<b>3. Material e métodos .....</b>	<b>35</b>
3.1 Amostragem.....	35

3.1.1. Amostras de DNA canino e de ectoparasitas.....	35
3.1.2. Amostras para teste de viabilidade do parasita no interior de ectoparasitas.....	36
3.1.3. Amostras para a PCR tempo real “single”.....	36
3.1.4. Amostras para a PCR tempo real multiplex.....	37
3.2. Manutenção de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> .....	38
3.3. Diagnóstico parasitológico.....	38
3.4. Diagnóstico sorológico.....	38
3.4.1. Produção do antígeno para ELISA.....	38
3.5. Diagnóstico molecular.....	39
3.5.1. Extração de DNA.....	39
3.5.2. Extração de RNA de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> e síntese de cDNA.....	40
3.5.3. PCR convencional e seleção dos primers.....	41
3.5.4. Eletroforese e gel de agarose.....	44
3.6. PCR em tempo real.....	44
3.6.1. Extração de DNA controle para confecção de curva padrão..	44
3.6.2. PCR em tempo real single.....	44
3.6.3. Reações de sequenciamento.....	45
3.6.4. PCR em tempo real multiplex.....	46
<b>4. Resultados.....</b>	<b>48</b>

4.1. Diagnóstico laboratorial.....	48
4.2. Pesquisa direta de <i>L. (L.) chagasi</i> em carrapatos.....	48
4.3. Frequência de infestação dos carrapatos e pulgas nos cães.....	48
4.4. PCR convencional.....	52
4.5. Padronização dos marcadores moleculares.....	53
4.6. Amostras ectoparasitas para teste de viabilidade do parasita.....	54
4.7. Reação de sequenciamento.....	56
4.8. Determinação do limite de detecção.....	57
4.9. Padronização da PCR em tempo real “single”.....	58
4.10. Escolha dos marcadores moleculares.....	59
<b>5. Discussão.....</b>	<b>62</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>74</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>75</b>
<b>8- Anexos.....</b>	<b>91</b>
8.1. Parecer do comitê de ética em pesquisa.....	92
8.2. Trabalho publicado: Colombo FA, Odorizzi RM, Laurenti MD, Galati EA, Canavez F, Pereira-Chiocola VL. Detection of <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. Parasitol Res. 2011;109(2):267-74.....	93

# 1. INTRODUÇÃO.

As leishmanioses são zoonoses causadas pelos parasitas protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, que eventualmente infectam a espécie humana, ocorrendo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. O gênero *Leishmania* acomete células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), podendo, de acordo com a espécie, causar doenças diversas com características clínicas e epidemiológicas distintas. A interação com o hospedeiro pode acontecer em células da pele, mucosas e/ou vísceras, tanto do homem, como de animais domésticos e silvestres. As espécies de *Leishmania* possuem uma organela característica chamada cinetoplasto, que difere muito das outras células eucarióticas conhecidas (Grimaldi e Tesh, 1993; Rey, 2001a).

## 1.1. Histórico.

O primeiro caso humano de leishmaniose foi estudado por Sir William Leishman, após cuidar de um soldado proveniente da cidade de Dum Dum, na Índia, e que apresentava um quadro de disenteria, febre e esplenomegalia, vindo a falecer em novembro de 1900 (Leishman, 1903). Durante a necrópsia, Leishman observou que as paredes do cólon estavam grossas e pigmentadas e o baço estava grande e friável. Após a realização do esfregaço a partir da polpa do baço, Leishman observou numerosos corpúsculos arredondados. Meses depois Charles Donovan descreveu um quadro semelhante (Donovan, 1903). Alphonse Laveran denominou esses parasitas de *Piroplasma donovani*, mas o então ganhador do prêmio Nobel de fisiologia, Sir Ronald Ross, acreditando se tratar de um novo gênero, propôs o nome de *Leishmania donovani* (Ross, 1903).

O primeiro caso brasileiro, proveniente de Corumbá, Mato Grosso do Sul e foi descrito por Migone, após a confirmação de formas promastigotas no sangue do paciente (Migone, 1913). Após observações, Evandro Chagas concluiu que a leishmaniose encontrada no Brasil diferia da descrita na Índia

(Chagas, 1936), o agente causador da leishmaniose visceral nas Américas é o parasita *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (Cunha & Chagas, 1937).

## 1.2. Taxonomia das leishmanias.

As espécies de parasitas que causam as leishmanioses pertencem ao reino Protista, sub-Reino Protozoa, que compreende organismos unicelulares nucleados. Ao filo Sarcomastigophora e ao subfilo Mastigophora consistindo de organismos que se locomovem por meio de flagelos ou cílios; e apresentam tipicamente um ou mais filamentos, respectivamente. Classe Zoomastigophora, que compreende seres heterotróficos, ou seja, são incapazes de produzir seu próprio alimento; ordem Kinetoplastida, apresentando uma organela típica chamada cinetoplasto, que contém DNA. Todas as espécies pertencem a família Trypanosomatidae, sendo essencialmente parasitas. Ainda são compreendidas no gênero *Leishmania*, contando com muitas espécies distintas. O gênero *Leishmania* foi subdividido em dois subgêneros, contendo as espécies causadoras das leishmanioses de acordo com o local de desenvolvimento do parasita no intestino do vetor natural, a saber: *Leishmania* com ocorrência no mundo todo; e *Viannia*, ocorrendo apenas nas Américas. No subgênero *Leishmania*, a reprodução do parasita ocorre na porção anterior e média do intestino do flebotomíneo, e compreendem as espécies *Leishmania (Leishmania) mexicana* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, responsáveis por lesões cutâneas localizadas ou difusas; e *L. (L.) infantum chagasi*, causadora da leishmaniose visceral americana (LVA). No subgênero *Viannia*, a reprodução possui uma fase prolongada da divisão ligada a parede posterior do intestino, seguida da migração de formas promastigotas para o intestino médio e anterior, compreendendo as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*, responsáveis pelas lesões cutâneas ou mucocutâneas. A

classificação usada deste trabalho foi proposta por Ralph Lainson e Jeffrey J. Shaw (Degraeve et al., 1994; Lainson & Shaw, 1998; Rey, 2001a)

### **1.3. Morfologia.**

Os parasitas flagelados da família Trypanosomatidae possuem aspectos diferentes de acordo com a sua forma evolutiva e com o hospedeiro parasitado.

A forma amastigota é um corpo pequeno (2 a 6 $\mu$ m de comprimento por 1,5 a 3 $\mu$ m de largura) achatado, imóvel, com núcleo relativamente grande e redondo ocupando de metade a dois terços do corpo celular. Apresenta o cinetoplasto bem visível e o flagelo reduzido. Esta forma é intracelular e é encontrada no hospedeiro vertebrado.

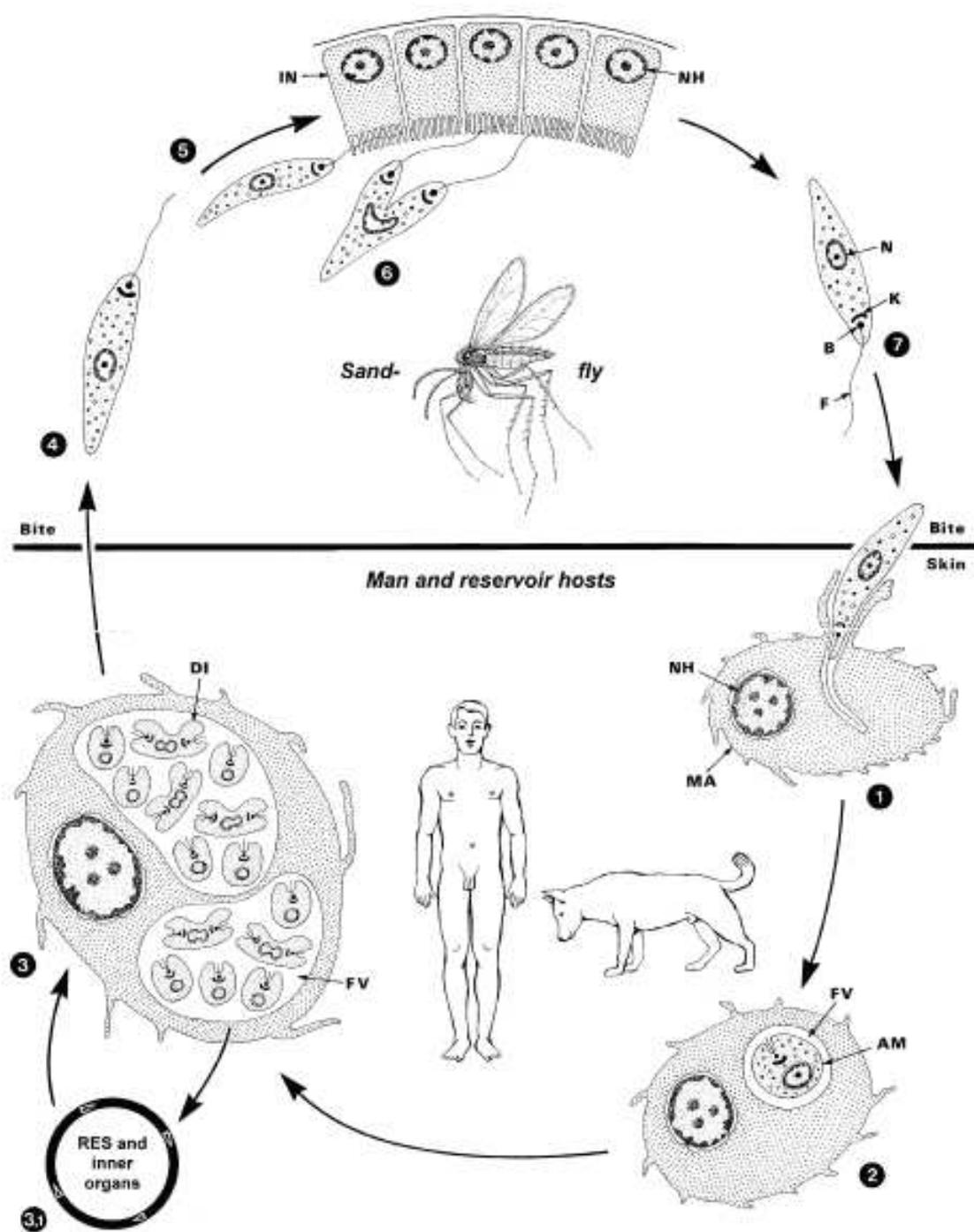
A forma promastigota é longa e achatada e é caracterizada pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo. O cinetoplasto se encontra na posição anterior do parasita, próximo ao flagelo. Tem dimensões de 14 a 20 $\mu$ m de comprimento, por 1,5 a 4 $\mu$ m de largura, e são aeróbicos.

O cinetoplasto possui um DNA específico representado pela sigla kDNA. O kDNA é constituído por milhares de minicírculos e por 20 a 50 maxicírculos, que codificam um pequeno número de RNA. O flagelo é composto por nove microtúbulos, dispostos em círculo e aos pares e mais dois centrais. (Grimaldi & Tesh, 1993; Rey, 2001a; Coura, 2005c).

### **1.4. Ciclo biológico das leishmanias.**

A reprodução desses parasitas ocorre pela divisão binária simples, onde a duplicação do cinetoplasto é anterior aos demais processos, iniciando pela produção de um novo flagelo. O núcleo se divide em seguida por endomitose. O ciclo da leishmaniose alterna entre um hospedeiro vertebrado e um invertebrado (Coura, 2005b). O ciclo pode ser explicado da seguinte forma e observado na **Figura 1**.

Após a picada do vetor, as promastigotas introduzidas são fagocitadas pelos macrófagos da pele do hospedeiro vertebrado (1). Entre 1 a 4 horas as formas promastigotas se transformam em amastigotas, iniciando uma reprodução por divisão binária dentro do vacúolo parasitóforo (2). Quando os macrófagos estão quase repletos com amastigotas (3), eles se rompem e liberam os parasitas que vão infectar outros macrófagos, determinando a leishmaniose cutânea. Caso a infecção seja por uma espécie causadora da leishmaniose visceral, as amastigotas são transportadas até os órgãos internos invadindo vários tipos de células e se reproduzindo por divisão binária (3.1). Quando flebotomíneos se alimentam em um hospedeiro infectado, ingerindo formas amastigotas durante o repasto sanguíneo (4), essas formas são transformadas em promastigotas no intestino (5), onde se multiplicam também por divisão binária (6). Rapidamente essas formas bloqueiam o intestino e se direcionam para a cavidade bucal, onde são introduzidas no novo hospedeiro durante o repasto (7).



**Figura 1:** Ciclo biológico das leishmanias. Legenda: AM, amastigota; B, corpo basal do flagelo; DI, estágio de divisão; F, flagelo livre; FV, vacúolo; IN, células do intestino; K, cinetoplasto; MA, macrófagos; N, núcleo; NH, núcleo da célula hospedeira. Adaptado de Mehlhorn, 2008.

## 1.5. Epidemiologia

As leishmanioses são endêmicas em 88 países, em quatro continentes, dos quais 72 países se encontram em processo de desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), ocorrem dois milhões de novos casos ao ano, sendo 1,5 milhão das formas cutâneas e 500 mil da forma visceral, mas apenas 600 mil casos são oficialmente relatados. Estima-se que 12 milhões de pessoas se apresentam infectadas em todo o mundo e 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de adquirir leishmaniose de forma geral (Ashford et al., 1992; WHO, 2011a; WHO 2011b).

As leishmanioses podem ser reunidas em quatro grupos clínicos. 1- leishmaniose cutânea (LC), caracterizada pela produção de lesões cutâneas limitadas ulcerosas ou não. 2- leishmaniose mucocutânea (LMC), quando aparecem lesões destrutivas nas mucosas do nariz, boca e faringe. 3- leishmaniose cutânea difusa (LCD), são formas disseminadas cutâneas que se apresentam em indivíduos anérgicos, 4- leishmaniose visceral (LV) ou calazar, forma onde os parasitos tem acentuado tropismo por células do SFM do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides.

Mais de 90% das leishmanioses cutâneas ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria, e 90% das muco-cutâneas ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru. Nas Américas, a leishmaniose cutânea é autóctone. Vários achados em cerâmicas pré-colombianas já representavam figuras com a doença. É distribuída em todo território nacional e em países vizinhos, como Venezuela, Paraguai, Colômbia, Peru, Equador, Bolívia. No período de 1988 a 2009, foram registrados mais de 26 mil casos de leishmaniose tegumentar por ano, e no ano de 2003 foi confirmada a autoctonia em todos os estados do país (MSB, 2011b) .

A leishmaniose visceral é endêmica em 62 países, com um total de 200 milhões de pessoas com o risco de adquirir a doença, e mais de 90% dos casos concentram-se em cinco países: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. A leishmaniose visceral ocorre na Ásia, na África, na Europa e nas

Américas central e do Sul. No Nepal os números são subestimados e variam de 1300-1800/ano (Bern et al. 2000). Já no Sudão, em 10 anos (de 1984 a 1994), ocorreram cerca de 100 mil óbitos devido ao calazar em uma população de 280 mil pessoas. Em algumas regiões a taxa de letalidade atingiu 70% (Zijlstra et al. 2001).

### **1.6. Leishmaniose tegumentar americana (LTA)**

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), que inclui as formas leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucocutânea (LMC) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD), é uma enfermidade causada por espécies de *Leishmania* de dois subgêneros: a *Viannia*, que inclui o complexo *L. braziliensis* e; a *Leishmania*, que inclui o complexo *L. mexicana* (Lainson & Shaw, 1987). A evolução da LTA depende da resposta do hospedeiro, a partir do local da picada do vetor, localização das lesões e evolução clínica (Marzochi & Marzochi, 1994). Em todos os casos as lesões, que podem ser simples ou múltiplas, começam como uma infecção localizada, não apresentando tropismo visceral, e evoluem para disseminada ou difusa dependendo da resposta celular do hospedeiro e da espécie do parasita. A forma mucocutânea da doença é causada pelo parasita *L. (V.) braziliensis*. Essa forma se caracteriza por lesões de vários tipos, principalmente na região nasal ou buco-faringiana, frequentemente destrutivas e mutilantes. O período de incubação é geralmente em torno de 2 a 3 meses, podendo ser mais curto ou mais longo, atingindo um ano (Coura, 2005a). Está presente em quase todo o hemisfério ocidental, desde o México até o norte da República Argentina (Rey, 2001b; Marzochi et al. 2002). No Estado de São Paulo surgiu de forma epidêmica, a partir de 1907, em indivíduos do sexo masculino em idade produtiva. Acometia trabalhadores que invadiam a mata para construir ferrovias como a Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, a extensão das linhas da Companhia Paulista de Estradas de Ferro e da Estrada de Ferro Sorocabana. Hoje, a transmissão da doença continua ocorrendo da maneira clássica. No entanto

o perfil epidemiológico da doença vem se modificando. A construção de habitações próximas a matas nativas observava-se somente na zona rural. Atualmente, as periferias da zona urbana estão próximas a restos de mata nativa. (Rey, 2001b; Marzochi et al. 2002; WHO,2011).

### **1.7. Leishmaniose visceral**

A leishmaniose visceral é caracterizada por produzir uma febre prolongada e irregular, hepatoesplenomegalia e anemia. O período de incubação varia entre dias, meses e anos, dependendo da espécie de *Leishmania* e da resposta imunológica do hospedeiro. O tropismo da espécie pelas vísceras esta relacionado ao fato dos parasitas conseguirem viver em temperaturas em torno de 37°C. Acomete principalmente o fígado, baço, medula óssea, linfonodos, rins, intestinos, pulmões e a pele. O complexo das espécies que causam a leishmaniose visceral é composto pelas espécies: *L. (L.) donovani*, encontrada principalmente na Índia, Paquistão e Bangladesh. É transmitida diretamente homem a homem pelos dípteros do gênero *Phlebotomus*. *L. (L.) infantum*, ocorre em áreas do Mediterrâneo, África Oriental, norte da Ásia e da China. Os cães atuam como reservatório de uma doença que atinge principalmente as crianças. *L. (L.) infantum chagasi* acomete tanto adultos como crianças, sendo transmitida pelos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, produzindo a LVA. (Rey, 2001a)

A LVA é uma infecção generalizada do sistema fagocítico mononuclear, causada por uma espécie de leishmania do complexo *L. donovani* (Marzochi et al, 2002) e transmitida pelo inseto vetor *Lutzomyia longipalpis*. Na América do Sul a espécie que causa a leishmaniose visceral é a *L. (L.) infantum chagasi*. Diferentes estudos apontam a *L. (L.) chagasi* muito semelhante a *L. (L.) infantum* (Momem et al, 1987; Mauricio et al., 1999). Outros encontraram diferenças entre as espécies quanto à antigenicidade e estrutura molecular, reforçando a sua diferenciação (Shaw, 1994; Lainson & Shaw, 1998).

A leishmaniose visceral americana é uma zoonose urbana tendo o cão como um dos principais reservatórios no ambiente doméstico (Deane & Deane, 1962). Os parasitas encontram um grande número de hospedeiros, frequentemente mal nutridos. Desta forma, a doença tem se manifestado com maior frequência em indivíduos de ambos os sexos, sendo que as crianças abaixo dos 15 anos a faixa etária mais gravemente afetada (Rey, 2001b; Marzochi et al. 2002; WHO,2011).

No Brasil foram registrados no período de 2003 a 2009, mais de 34 mil casos de leishmaniose visceral. Em 2009 a maioria dos casos foi registrado na região Nordeste (47,5%), seguido pela Norte (19,2%), Sudeste (17,4%), Centro Oeste (7,4%) e Sul (0,2%). Aumento progressivo foi registrado em 21 Estados, atingindo as cinco regiões do país (Evans et al., 1992; Monteiro, 2002, MSB, 2011a). Dados recentes mostram que a maioria dos infectados é do sexo masculino (63,9%) e crianças menores de 10 anos, apresentando índice de 48,9% (MSB, 2011a).

Até a década de 80, a maioria dos casos concentrava-se em áreas rurais dos municípios. Esse perfil mudou e vários casos são notificados nas áreas urbanas (Camargo-Neves, 2004, CVE, 2011). Novos casos são registrados em áreas consideradas livre da doença e com destaque para regiões urbanas. Já foram registrados casos autóctones em grandes centros urbanos como São Luís, Teresina, Fortaleza, Natal, Belo Horizonte, Palmas, Campo Grande, Araçatuba e Corumbá (Lindoso & Goto, 2007; MSB, 2007).

No Estado de São Paulo, a doença era conhecida apenas por meio de casos importados de outros estados brasileiros. No entanto, em 1998 foram detectados cães portadores de LVA, no município de Araçatuba localizado na região oeste do Estado de São Paulo. Este episódio desencadeou uma investigação epidemiológica que levou a identificação de *L. (L.) infantum chagasi*, como agente causal, confirmando assim a transmissão autóctone de LVA em cães da área urbana de Araçatuba e outros municípios da região. O primeiro caso humano de LVA autóctone da região foi detectado em 1999 (Camargo-Neves & Katz, 1999; Camargo-Neves et al., 2001; 2002). A doença atualmente constitui-se em um sério problema de saúde pública,

pois está em franca expansão no Estado de São Paulo. O vetor vem se adaptando e a infecção se alastrando em cães e homens de zonas urbanas de pequeno e médio porte (Costa et al., 1997). Desde o primeiro caso, em 1999, até julho de 2011 foram notificados 837 casos e 79 óbitos nos 27 municípios da região de Araçatuba. Na cidade de Mirandópolis, no período de 2002 a 2011, foram registrados 47 casos e 3 óbitos. (CVE-SP, 2011). Em 2003, foram registrados casos autóctones caninos em Cotia, município pertencente à região metropolitana de São Paulo (Tolezano et al., 2003).

Dados atuais do Estado de São Paulo mostram que 100 municípios já apresentam transmissão de LVA, sendo que casos autóctones, humanos e caninos, estão presentes em 66 municípios enquanto 29 municípios apresentam apenas transmissão canina. Casos autóctones caninos foram detectados em cinco municípios (Cotia, Embu, Rubinéia, Santa Albertina e Nova Castilho) e humanos em Jaú, Quintana e Álvaro de Carvalho, porém em nenhuma dessas oito localidades foi confirmada a presença do vetor *Lu. longipalpis* (SES, 2011).

### **1.8. Principais hospedeiros vertebrados**

Os parasitas causadores da leishmaniose são encontrados parasitando muitas espécies de animais, porém somente algumas podem ser consideradas reservatórios. Uma espécie para ser reservatório deve dar condições para que o parasita seja mantido e participe de um ciclo e garanta a sua perpetuação (Tolezano, 1994).

Como reservatórios silvestres podem ser citados canídeos como as raposas (*Dusysion vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais como o *Didelphis marsupialis* (Monteiro et al., 1994).

No ambiente doméstico o cão é o principal reservatório. Estudos soroepidemiológicos tem mostrado um grande número de animais soropositivos, porém, assintomáticos. Achados demonstram que tanto cães sintomáticos (53%) como assintomáticos (43,4%) apresentavam DNA de *L.(L.) infantum chagasi* no sangue periférico, confirmando a alta prevalência

de infecção por *Leishmania* em cães assintomáticos e sugerindo que estes podem agir como portadores do parasito em áreas endêmicas (Gomes et al., 2008; Moshfe et al, 2009).

Guarga et. al, (2000) demonstraram que pele saudável dos cães é mais atrativa aos flebotomíneos, conseqüentemente com o agravamento da situação da pele a atração é diminuída. Esse comportamento das fêmeas do flebotomíneo pode aumentar o risco de infecção de cães saudáveis, já que as fêmeas tem preferência por pele íntegra. Como os sinais clínicos da doença são variáveis, estima-se que em torno de 50% dos cães infectados não apresentem qualquer sinal clínico, e por apresentarem a pele sadia, continuam sendo fontes de infecção para o flebotomíneo (Queiroz et al., 2009).

Os cães foram relacionados em todos os surtos de leishmaniose registrados e não existem relatos na literatura de epidemia de leishmaniose visceral sem a presença de cães infectados (Oliveira et al., 2008). Estudo realizado na cidade de Belo Horizonte, mostra que proprietários de cães apresentam mais de duas vezes a chance de se infectar com *L. (L.) infantum chagasi*, quando comparados aos não proprietários, e essa chance aumenta com o aumento do número de cães na residência (Borges, 2006).

### **1.9. Principais vetores.**

Os principais vetores de agentes das leishmanioses são os flebotomíneos; dípteros pilosos, pequenos, de cor castanho-claro ou palha. Quando pousados, as asas assumem uma postura ligeiramente levantada e permanecem entreabertas.

Pertencem ao Reino Animalia, que compreende organismos multicelulares, Filo Arthropoda constituído de organismos com simetria bilateral e o corpo segmentado e apêndices articulados com formas e funções variadas. Fazem parte da Classe Insecta, caracterizada por cabeça, tórax e abdome diferenciados; e Ordem Diptera, possuindo um par de asas membranosas e outro par de asas atrofiadas, e um aparelho bucal picador-

sugador. Pertence ainda a Família Psychodidae, com asas lanceoladas e densamente pilosas. As fêmeas adultas são hematófagas, porém podem se alimentar de sucos vegetais, como fazem os machos. Os flebotomíneos adultos normalmente se alimentam a noite, do crepúsculo ao início da manhã. Eles têm uma capacidade de vôo limitada a curtas distâncias, são sensíveis ao calor e tem um exoesqueleto delicado (Schmidt e Roberts, 2009a). No Brasil as principais espécies vetoras da leishmaniose cutânea americana são: *Lutzomyia whitmani*, *Lu. pessoai*, *Lu. migonei*, *Lu. intermedia*, *Lu. fischeri* e *Lu. wellcomei* (Lainson & Rangel, 2005).

Existem cerca de 30 espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão dos agentes da leishmaniose visceral no mundo (Desjeux, 1996). No Brasil o principal vetor é *Lutzomyia longipalpis* (Lainson & Shaw, 1987; Galati, 1997). No Estado de São Paulo, *Lu. longipalpis* foi detectado pela primeira vez na área urbana do município de Araçatuba em 1997 (Costa et al., 1997). A seguir, foi registrado no ambiente urbano de 44 municípios da região oeste do Estado, sendo a única espécie relacionada com os focos de transmissão da doença. Apesar da Região Metropolitana de São Paulo apresentar a enzootia canina (Tolezano et al., 2003), ainda não foi detectada a presença de *Lu. longipalpis*. Este fenômeno leva a supor que outra espécie de flebotomíneo possa estar envolvida com a transmissão. Entre os flebotomíneos coletados nos municípios desta região (Cotia, Embu e Itapeverica da Serra), destacam-se *Pintomyia fischeri*, *Migonemyia migonei* e *Evandromyia edwardsi*, porém, ainda não foi elucidado o mecanismo de transmissão nessa região (Camargo-Neves, 2004).

#### **1.10. Vetores alternativos**

Nas áreas com a presença de leishmaniose visceral canina e onde a ocorrência de flebotomíneos não foi observada, ou se encontra em baixa quantidade, suspeita-se de outros mecanismos de transmissão entre esses animais (Sherlock, 1964). Entre esses possíveis vetores destacam-se a participação da pulga *Ctenocephalides felis felis*, e o carrapato

*Rhipicephalus sanguineus* devido à frequência e intensidade com que ambos ocorrem em cães (Linardi & Nagem, 1973; Fortes, 1997; Linardi & Guimarães, 2000; Coutinho et al., 2005).

Os carrapatos estão entre os grupos mais antigos e bem sucedidos de artrópodes. Na Grécia antiga já eram descritos como pragas e são ectoparasitas de praticamente todo tipo de vertebrados no mundo. Em 1893 os carrapatos foram os primeiros artrópodes incriminados como vetores de uma doença parasitária (*Babesia bigemina*), décadas antes da descoberta dos vetores da malária. Os carrapatos ocupam o segundo lugar nas doenças transmitidas por artrópodes no mundo todo, atrás somente dos mosquitos. Os carrapatos podem transmitir bactérias, vírus e parasitas. (Goodman et al., 2005).

A espécie de carrapato estudada neste trabalho pertencem ao Reino Animalia, Filo Arthropoda. Classe Arachnida, Subclasse Acari, Ordem Parasitiforme; Família Ixodidae, e Gênero *Rhipicephalus*. Apresentando cefalotórax, abdome fundido e um aparelho bucal picador-sugador denominado capítulo ou gnátossomo e um escudo dorsal, o capítulo situado na borda anterior do corpo. São conhecidos como carrapatos duros. Possuem quatro pares de patas no estágio adulto e ninfal, mas apenas três no estágio larval. A espécie *R. sanguineus* é cosmopolita, sendo o cão o seu principal hospedeiro. O carrapato passa por três estágios durante seu ciclo de vida, larva, ninfa e adulto, se alimentando de sangue em todos os estágios. Os ixodídeos se ligam firmemente nos hospedeiros usando suas peças bucais e uma espécie de cimento, permanecendo por vários dias até terminar o processo de alimentação. Os machos se alimentam por vários dias e somente se soltam quando percebem a presença de fêmeas sexualmente ativas (Goodman et al., 2005)

O interior dos carrapatos é uma cavidade aberta chamada hemocele, onde os órgãos vitais, glândulas salivares, intestinos órgãos reprodutores, são banhados por um líquido circulante chamado hemolinfa. Embora seja frequentemente confundida com sangue, a hemolinfa não faz o transporte de oxigênio por não conter hemoglobina, e contém uma alta concentração de

proteínas. O maior órgão interno dos carrapatos é o intestino médio. A digestão do sangue no interior dos carrapatos é quase sempre intracelular, os eritrócitos são digeridos e a hemoglobina é liberada. Na porção anterior do corpo se localizam as duas glândulas salivares ligadas as peças bucais por dois ductos. No processo de alimentação, algumas partes das glândulas salivares se transformam em secretoras, eliminando o excesso de líquidos presentes no sangue, concentrando no interior dos carrapatos apenas as células (Goodman et al., 2005).

Os ixodídeos são carrapatos de três hospedeiros, ou seja, após cada alimentação o carrapato fica ingurgitado, deixa o hospedeiro e cai no solo para se desenvolver. Após a ecdise volta a se alimentar no mesmo ou em outro hospedeiro. As fêmeas ingurgitadas desprendem-se do hospedeiro em torno do oitavo dia. Após duas a três semanas começam a ovipor. A oviposição completa é em torno de 2500 ovos. Decorridos quatro a cinco semanas esses ovos eclodem, liberando as larvas. Essas podem resistir até 4 meses em temperatura ambiente (22 a 24°C) antes da primeira alimentação, porém não toleram temperaturas baixas. As larvas alimentam-se de 3 a 6 dias, desprendem-se do hospedeiro, caem no solo e após seis semanas mudam de estágio para ninfas. As ninfas precisam ser alimentadas no máximo 1 mês após a ecdise. No estágio de ninfa, os carrapatos alimentam-se por 6 dias, em média, e levam mais 4 ou 5 semanas para mudar para o estágio adulto. O ciclo de vida total gira em torno de 170 dias, dependendo da temperatura, umidade e luminosidade. As fêmeas adultas morrem após a oviposição. Ambos os sexos alimentam-se de sangue (Little et al, 2007; Troughton & Levin, 2007).

Uma vez escolhido o local de alimentação, o carrapato começa o processo de ligação e corte da pele pelas quelíceras. Após a ferida aberta, o carrapato dispõe os palpos horizontalmente do lado de fora da ferida e introduz o capítulo no interior da ferida. As glândulas salivares começam a secretar saliva contendo proteínas que se solidificam ao redor das peças bucais do carrapato formando uma ligação forte com a pele, e mantendo o carrapato fixado. Essa ligação pode demorar horas para acontecer. O longo

período de ligação do ectoparasita ao hospedeiro permite aos carrapatos ingerir uma grande quantidade de sangue em uma única picada. A alimentação ocorre uma vez em cada hospedeiro, alimentando em cada fase em um novo hospedeiro, sempre voltando ao solo após cada alimentação. A saliva contém uma grande variedade de proteínas com varias propriedades, como supressão da atividade inflamatória e dilatação das paredes dos vasos. (Goodman et al., 2005)

As pulgas também pertencem ao Filo Arthropoda, porém da Classe Insecta. Fazem parte da Ordem Siphonaptera, com aparelho bucal picador-sugador, sem asas e com pernas bem desenvolvidas. As pulgas são animais com metamorfose completa, ou seja, passam pelos estádios de ovo, larva, pupa e adulto. As pulgas também são conhecidas por transmitirem bactérias como a da peste (*Yersinia pestis*), além de larvas de cestódeos como o *Dipylidium*, *Hymenolepis*. (Schmidt e Roberts, 2009b). A espécie estudada neste trabalho foi a *Ctenocephalides felis felis*.

### **1.11. Diagnóstico das leishmanioses**

O diagnóstico das leishmanioses baseia-se em três abordagens: diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular.

O diagnóstico parasitológico consiste na evidenciação do parasita, podendo ser pela pesquisa microscópica de formas amastigotas intracelulares, em amostras biológicas após coloração por Giemsa ou coloração de Leishman. As amostras são obtidas diretamente da lesão por raspagem da borda da lesão, aspiração da borda inflamada ou biopsia, no caso de suspeita de leishmaniose cutânea. No caso de leishmaniose visceral, as amostras são coletadas por punções aspirativas de baço, linfonodos, medula óssea ou crista ilíaca. (Rey, 2001c; Ferreira & Ávila, 2001b).

O diagnóstico também pode ser realizado pela inoculação do material recém coletado em um meio de cultura para *Leishmania spp*, como o NNN (Neal, Novy, Nicolle) com uma fase líquida de LIT (Liver Infusion Triptose) ou

solução de salina estéril. O isolamento de espécies de *Leishmania* também pode ser realizado *in vivo*, com a inoculação na pele ou no peritônio de animais susceptíveis. O hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) é altamente susceptível a *L. (L.) infantum chagasi*, e a infecção progride para a morte do animal. O curso clínico da infecção e os mecanismos imunopatológicos no hamster é muito similar ao caninos e humanos, por isso é considerado um bom modelo animal para o estudo da leishmaniose visceral. O diagnóstico parasitológico apresenta baixa sensibilidade e alta especificidade. A coleta é invasiva podendo causar desconforto ao paciente, além de exigir complexos procedimentos médicos ou veterinários (Moshfe et al., 2009; Ferreira & Ávila, 200b1; Rey, 2001c).

### **1.12. Métodos imunológicos**

Devido a baixa sensibilidade do método direto e ao longo tempo dos métodos de cultura, vários métodos sorológicos (ELISA, imunofluorescência indireta, aglutinação direta, imunoblot) foram desenvolvidos. Os testes sorológicos existentes apresentam sensibilidade e especificidade variáveis e ainda não existe um teste diagnóstico padrão ouro (Schallig & Oskam, 2002).

Os testes imunológicos são relativamente sensíveis, porém pouco específicos, tanto pela presença de reações cruzadas com antígenos de outros tripanosomatídeo, como também por não serem capazes de distinguir a espécie de *Leishmania*, nem tampouco diferenciar entre infecção ativa ou passada. (Grimaldi & Tesh, 1993)

A reação a imunofluorescência indireta (RIFI) também é bastante utilizada no diagnóstico das leishmanioses. São utilizadas formas promastigotas fixadas em lâminas, e testadas frente a soros de pacientes. Apresenta reações cruzadas com soros de pacientes chagásicos, com hanseníase, tuberculose e outras patologias. ELISA apresenta maior sensibilidade e especificidade, principalmente quando são utilizados antígenos específicos como, por exemplo, o rK39. (Ferreira & Ávila, 2001a).

A reação intradérmica de Montenegro (IDRM) é um teste para avaliar a hipersensibilidade tardia de pacientes com leishmaniose, sendo um método simples e útil no diagnóstico da leishmaniose cutânea, porém tendo resultados negativos na leishmaniose visceral (Ferreira & Ávila, 2001a).

### **1.13. Métodos moleculares e caracterização de *Leishmania***

Além dos métodos convencionais de pesquisa dos parasitas, tais como microscopia e cultura, os moleculares tem sido amplamente utilizados no diagnóstico de doenças. A sensibilidade desses métodos depende da escolha da sequência alvo e do objetivo do estudo (Mary et al, 2004).

As espécies de *Leishmania* tem de 20 a 25 cromossomos com elevado grau de polimorfismo. O DNA genômico é composto por 25% de sequências repetitivas, 13% por sequências moderadamente repetitivas e 60% por sequências únicas. Isso permite uma variedade muito grande de sequências alvo para a reação da polimerase em cadeia PCR (Lainson & Shaw, 1998).

Embora vários métodos tenham sido validados para o diagnóstico das leishmanioses, a PCR se mostrou como uma boa ferramenta entre os pesquisadores. Além da detecção do parasita, a metodologia é utilizada para taxonomia, controle de tratamento, análises de vetores e estudos epidemiológicos (Degraeve et al., 1994; Marzochi et al., 1999; Reithinger & Dujardin, 2007).

A PCR em tempo real apresenta alguma vantagem sobre a PCR convencional, como por exemplo, a diminuição dos riscos de contaminação, pois as leituras são realizadas sem que o tubo precise ser aberto, evitando inclusive a contaminação de outras áreas no laboratório. Outra vantagem seria a quantificação dos parasitas por miligrama de tecido. Isso permite a avaliação de tratamento ou o monitoramento da progressão ou regressão da doença. (Reithinger & Dujardin, 2007).

Baseado em características moleculares, este estudo foi desenhado para permitir a detecção e caracterização de amostras de *L.(L.) infantum*

*chagasi* em carrapatos e pulgas, retirados de cães com diagnóstico clínico sugestivo para leishmaniose visceral canina no Estado de São Paulo.

Este trabalho visou responder as questões sobre a transmissão, permanência e a resistência dos parasitas da leishmaniose no interior dos ectoparasitas, além de criar novas ferramentas para o diagnóstico laboratorial.

## 2- Objetivo geral

Investigar a possibilidade de transmissão de *L. (L.) infantum chagasi* por transmissores alternativos, como a pulga (*Ctenocephalides felis felis*) e o carrapato (*Rhipicephalus sanguineus*).

### 2.1- Objetivos específicos

- 1- Padronizar a extração de DNA e RNA de *Leishmania* em sangue de animais infectados e ingerido por carrapatos e pulgas,;
- 2- Padronizar a PCR em tempo real para o diagnóstico molecular das leishmanioses;
- 3- Padronizar a PCR Multiplex em tempo real para a diferenciação das espécies do subgênero *Leishmania* (complexo *L. donovani*), das espécies do subgênero *Viannia*.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Amostragem**

##### **3.1.1. Amostras de DNA canino e de ectoparasitas.**

Durante agosto de 2008 a maio de 2009, foram coletadas amostras de 73 cães no município de Mirandópolis, localizado na região noroeste do estado de São Paulo e distante cerca de 70 quilômetros de Araçatuba. O município tem uma população estimada em 27.483 habitantes e é classificado com município com transmissão canina e humana. Nos últimos dez anos foram encontrados quarenta e sete casos de LVA em humanos, e três óbitos. No ano de 2009 não foram registrado casos humanos neste município (IBGE, 2010; CVE, 2011) Os cães foram trazidos ao Centro de Controle de Zoonoses, como parte do programa padrão da política de controle de leishmaniose visceral canina. A maioria dos animais era de cães de rua ou entregues pelos donos devido ao aparecimento de sinais clínicos da doença. Os animais foram selecionados considerando fatores de risco epidemiológicos, como a proximidade de outros cães infectados, diagnóstico sorológico, sinais ou sintomas da doença. Todos os cães mostraram ao menos três sinais clínicos da doença, como onicogribose, alopecia, linfadenopatia, lesões ulcerativas, coceira intensa, pelagem opaca, seborréia, dermatites, perda do apetite e caquexia.

Após a confirmação dos casos suspeitos da doença pelo exame clínico e sorológico, os cães foram sedados e posteriormente eutanasiados para coleta das amostras de sangue e fragmentos de linfonodos, e imediatamente estocados a -20°C. A seguir foi realizada a remoção de carrapatos e pulgas do corpo inteiro do animal utilizando pinças ou os dedos, e imediatamente após a remoção, os ectoparasitas foram acondicionado em tubos plásticos. Os carrapatos foram identificados e separados em grupos de ninfas, fêmeas adultas e machos adultos de acordo com a classificação proposta por Aragão (1936). As pulgas foram identificadas de acordo com a

classificação de Linardi & Guimarães (2000). O número de espécimes (carrapatos e pulgas) coletados por animal variou de 10 a 50. As amostras biológicas congeladas e os ectoparasitas foram transportados até o Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, onde todo material foi estocado a -20°C até o momento do uso após 7 a 10 dias da coleta..

### **3.1.2. Amostras para o teste de viabilidade do parasita no interior de ectoparasitas.**

Os experimentos de viabilidade foram realizados com 25 ninfas coletadas de dez cães. Estas foram mantidas em temperatura ambiente acondicionadas em placas de Petri até atingirem o estágio adulto. Após a mudança de estágio, os adultos foram sacrificadas e o RNA extraído em 2 pools de 10 exemplares. Cinco exemplares morreram antes da mudança e não foram utilizados na extração.

### **3.1.3. Amostras para a PCR tempo real “single”**

Um total de 228 amostras de DNA foi selecionado para a validação da PCR em tempo real, sendo 202 amostras clínicas provenientes de fígado, baço, pele, sangue e/ou linfonodo de cães enviadas ao Instituto Adolfo Lutz como parte do programa de controle da LVA para diagnóstico confirmatório. O DNA foi extraído e as amostras foram divididas em três grupos (Grupos I, II e III). As 26 amostras utilizadas como controle, foram extraídas de culturas e divididas em dois outros grupos (Grupos IV e V).

Grupo I: 99 amostras de DNA de cães com diagnóstico clínico, sorológico e molecular (150/152 e RV1/RV2) positivos para *L. (L.) infantum chagasi*. Todos os animais apresentaram ao menos três dos sinais clínicos da doença.

Grupo II: 96 amostras de DNA de cães com diagnóstico sorológico e molecular negativos para *L. (L.) infantum chagasi*.

Grupo III: 7 amostras de DNA de cães positivos para *L. (V.)*

*braziliensis*.

Grupo IV: 2 amostras DNA extraído de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, e 2 amostras da cepa y de *Trypanosoma cruzi* extraído de cultura.

Grupo V: 22 cepas padrão de *Leishmania* da Organização Mundial da Saúde (OMS) foram analisadas. As cepas padrão utilizadas neste estudo foram: *L. (L.) mexicana* (MNYC/BZ/1962/M379), *L. (L.) mexicana* (MHON/BZ/1982/BEL21), *L. (L.) mexicana* (MORY/PA/86/GML), *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L. (L.) donovani* (MHOM/ET/1967/HU3), *L. (L.) donovani* (MHOM/IN/1980/DD8), *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75), *L. (L.) infantum* (MHOM/TN/1980/LEM235), *L. (L.) major* (MRHO/SU/59/P-strain), *L. (L.) major* (MHOM/SU/1973/5-ASKH), *L. (L.) major* (MHOM/IL/1967/JERICHOII), *L. (L.) tropica* (MHOM/SU/1974/K27), *L. (L.) tropica* (MHOM/SU/1958/STRAIN OD), *L. (L.) aethiopica* (MHOM/ET/1972/L100), *L. (L.) pifanoi* (MHOM/VE/1957/LL1), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/1971/LS94), *L. hertigi* (MCOE/PA/1965/C8), *L. henrietti* (MCAV/BR/1945/L88) e *L. gerbilli* (MRHO/CN/1960/GERBILLI).

#### **3.1.4. Amostras para a PCR tempo real multiplex**

Para a padronização da PCR em tempo real multiplex, foi elaborado um painel de 313 amostras de DNA. As amostras foram divididas da seguinte forma: 220 amostras de DNA humano ou canino, extraídas de sangue ou tecido com diagnóstico positivo para leishmaniose; e 93 amostras de DNA humano extraídas de sangue, tecidos ou fezes, com diagnóstico negativo para leishmaniose, porém positivo para outras parasitas como *Plasmodium* spp., amebas de vida livre (*Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*), *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, e *Trypanosoma cruzi*. As extrações de DNA foram conduzidas da mesma

forma, por kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

### **3.2. Manutenção de *Leishmania (L.) infantum chagasi***

Parasitas de *L. (L.) infantum chagasi* foram mantidos em cultura em meio Eagle suplementado com 292 mg/L L-glutamina, 110 mg/L de piruvato de sódio, 2,2 g/L de Bicarbonato de Sódio, 0,02% de hemina, 10% de soro fetal bovino previamente inativado pelo calor, e 200 µg/ml de gentamicina (Armstrong & Patterson, 1994; Gomes et al., 2007). Na fase estacionária da cultura, os parasitas foram retirados, lavados por três vezes em solução salina tamponada (PBS; pH 7,2) e centrifugadas a 1000g por 10 minutos. Os sedimentos contendo os parasitas foram utilizados para obtenção de DNA usado como controle nas técnicas moleculares e como antígeno para ELISA.

### **3.3. Diagnóstico parasitológico.**

A presença de *L. (L.) infantum chagasi* foi investigada por pesquisa direta em lâminas. O conteúdo intestinal dos carrapatos foi colocado entre lâmina e lamínula contendo solução salina estéril e foi observado ao microscópio (aumento de 400X). Estes carrapatos também tiveram a porção distal de uma ou mais patas retirada para a coleta de hemolinfa e também foram observadas ao microscópio a fresco. Após a pesquisa, estas lâminas foram secas e coradas pelo método do panótico rápido e novamente observadas em microscópio, no aumento de 1000X. Um procedimento semelhante foi utilizado para pesquisa direta em pulgas. As pulgas foram comprimidas entre lâmina e lamínula, após umidificação com uma gota de solução salina estéril. Após a análise a fresco, as lâminas foram fixadas e coradas da mesma maneira e observadas em aumento de 1000X.

### **3.4. Diagnóstico sorológico**

#### **3.4.1. Produção do antígeno para ELISA**

Um antígeno solúvel bruto de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foi utilizado para ELISA. O precipitado foi lisado por congelamento e descongelamento, seguido por sonicação e centrifugação a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado na concentração de 10µg/mL em microplacas. As amostras de soro canino foram diluídas 1:400 em PBS-tween, e a ligação com os anticorpos foi detectada utilizando conjugado anti-IgG canino-fosfatase alcalino, seguido da solução cromogênica (10mg/mL de pNPP). A densidade óptica (D.O.) da reação foi medida no comprimento de onda de 405nm. Controles positivos e negativos de soro foram adicionados em cada placa para padronização das leituras. O ponto de corte (cut off) entre os resultados negativos e positivos foi calculado como a média dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão. A sensibilidade do método utilizando um antígeno específico foi de 96,9% e a especificidade de 87,5% em ensaios com reatividade cruzada. Os ensaios de ELISA foram realizados pela Dra. Marcia Dalastra Laurenti, do Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (da Matta et al, 2011).

### **3.5. Diagnóstico molecular**

#### **3.5.1. Extração de DNA.**

Todas as amostras de linfonodos dos cães foram processadas conforme protocolo básico de extração de DNA descrito por Sambrook et al. (1989) e com as modificações e descritas previamente (Gomes et al. 2007). As amostras foram maceradas e dissolvidas em tampão de lise (Tris-HCl, 10 mM, pH 8.0; EDTA 10mM; SDS, 0,5%; N-laurilsarcozil, 0,01%; proteinase K, 100µg/mL) e incubados em banho-maria a 56°C de uma a quatro horas, até a lise completa do tecido. O DNA foi extraído pelo protocolo fenol/clorofórmio/isoamil e precipitado com isopropanol. O DNA precipitado foi lavado com etanol a 70% e centrifugado a 10.000g por 10 minutos. O

sedimento foi dissolvido em água pura. Todo material genético de DNA, foi dosado no Nanodrop ND100 (Thermo Scientific) e sua concentração foi corrigida para 250 ng/μl nas amostras com maior concentração.

Com a implantação dos kits de extração na rotina do laboratório optou-se pela mudança na metodologia de extração utilizando também os kits comerciais. A vantagem foi devida a padronização dos reagentes, maior pureza nas extrações e menos interferentes e inibidores de reação. O material genético dos ectoparasitas foi extraído em grupos contendo de dois a cinco espécimes. Este número dependia da infestação de cada cão. Os grupos de carrapatos ou pulgas foram congelados em nitrogênio líquido e macerados com ajuda de um pilão descartável. O DNA de todos os ectoparasitas foram extraídos pelo kit Purelink Genomic DNA kit (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.5.2. Extração de RNA de *L. L. Infantum chagasi* e síntese de cDNA**

Amostras de carrapatos ou pulgas também foram processadas conforme protocolo básico de extração de RNA com colunas de afinidade. Os ectoparasitas foram congelados e mantidos a -80°C, macerados ainda congelados e lisados com tampão específico do kit (Spin Tissue RNA Mini Kit, Invisorb). Após a lise, o RNA contido no sobrenadante foi extraído por colunas de afinidade e congelado imediatamente. A seguir, as amostras de RNA foram reversamente transcritas para cDNA. A uma quantidade de 11μl do RNA foi adicionado 1μL de uma mistura contendo os quatro “dntp’s”, 1μl de “random primers”. A seguir as reações foram levadas ao termociclador por aproximadamente 5 minutos a 65°C. Após este tempo foram retiradas e colocadas no banho de gelo por 20 segundos. Ao final deste tempo foram adicionado as misturas, 2μl DTT e o 4μl tampão (Tris-HCl, 250mM, pH 8,3 ; KCl, 375mM; MgCl<sub>2</sub> 15mM) e colocado novamente no termociclador por 20 segundos a 37°C. Após os 20 segundos, adiciona-se 1 μl da enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase), que é a

responsável para a complementação do RNA para cDNA que é de fita dupla.

O grau de pureza das amostras foi analisado no Nanodrop ND100 pela medida da absorbância 260/280 (Sambrook et al.,1989). Após a verificação da integridade das amostras por eletroforese e PCR, estas foram congeladas a -20° C para o posterior uso em PCR quantitativo em tempo real.

### **3.5.3. PCR convencional e seleção dos primers.**

As amplificações foram realizadas utilizando um kit comercial (*GoTaq<sup>®</sup>Green Master Mix - Promega*) contendo 2 corantes (azul e amarelo) que permitem monitorar o progresso das amostras durante a eletroforese. Cada 12,5 µl do “mix” continha 1 unidade de Taq DNA polimerase em 10mM Tris-HCl, pH 8.5; 50mM KCl; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> e 200 mM de cada um dos desoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Cada reação foi realizada adicionando-se 5 µl do DNA alvo e 50 pmol de cada marcador molecular em um volume final de 25 µl. As amplificações foram realizadas utilizando um termociclador (*LongGene*).

A PCR realizada a partir do DNA e do cDNA foram executadas da mesma forma. Foram adotadas medidas de controle em todas as etapas da reação. A cada conjunto de reações foram adicionados dois controles negativos, um contendo apenas água pura e outro com DNA extraído de amostra sabidamente negativa para *Leishmania sp.*; e um controle positivo, extraído de cultura de promastigotas de cepa padrão de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/LD/strain 46).

A detecção do DNA de *Leishmania* nos cães e nas amostras dos carrapatos e pulgas foi realizado com 1: 150/152 (5'GGG KAG GGG CGT TCT SCG AA3') e (5'SSS WCT ATW TTA CAC CAA CCC C3') marcador molecular que identifica o gênero *Leishmania spp.* Amplifica um fragmento de 120pb da região conservada dos minicírculos do kDNA (Passos et al., 1999). A PCR foi composta de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de uma segunda etapa composta de desnaturação (95°C

por 45 segundos), anelamento (55°C por 45 segundos) e extensão (72°C por 45 segundos) repetida por 30 ciclos. A terceira etapa constituiu em um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

2: RV1/RV2 (5'CTT TTC TGG TCC CGC GGG TAG G3' e 5'CCA CCT GGC CTA TTT TAC ACC A3'), marcador molecular que identifica *L. (L.) infantum chagasi* e amplifica um fragmento de 145pb de uma região variável do minicírculo do kDNA (região LT1), específica para o complexo *L. (L.) donovani* (Ravel et al., 1995, Le Fichoux et al., 1999; Gomes et al., 2007). As amplificações foram constituídas de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos. A segunda etapa foi composta de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (60°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 30 segundos) repetida por 30 ciclos. A última etapa constituiu em um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

3; Gapdh-4 (5'AGG CTG AGA ACG GGA AAC TT3' e 5'ATT AAG TTG GGG CAG GGA CT3'), para controle de extração, que amplifica um fragmento de 911pb da gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase canina (Kullberg et al., 2006). Este marcador foi utilizado para verificar a integridade do DNA canino extraído, e se caso houvesse algum agente inibidor de reação, o resultado desta PCR seria negativa. Esta reação foi realizada simultaneamente e com as mesmas condições do protocolo RV1-RV2.

Para a etapa seguinte foram escolhidas novas sequências-alvo de regiões específicas de *L. (L.) infantum chagasi*, de onde foram desenhados cinco novos marcadores moleculares (Tabela 1). Esses marcadores foram desenhados a partir de sequências parciais de mRNA para a determinação da viabilidade dos parasitas. As sequências-alvo foram escolhidas de acordo com sequências já descritas no GenBank e kinetoplast minicircle sequence database, disponíveis em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> e <http://www.ebi.ac.uk/parasites/kDNA/Source.htm> (Barker, 2008), respectivamente. Estas sequências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal W versão 2.0 (Larkin et al., 2007). Os marcadores moleculares foram desenhados com auxílio de softwares específicos (OLIGO Primer Analysis Software V.7) nas regiões mais conservadas

evolutivamente. As regiões escolhidas, bem como a sua localização no gene de *L. (L.) infantum chagasi*, e o nome dos marcadores são:

- 1- *Leishmania infantum* JPCM5 paraflagellar rod protein 2C (LinJ16.1500) partial mRNA. XM\_001464593, marcador PRP
- 2- *Leishmania infantum* JPCM5 endoribonuclease L-PSP (pb5) LinJ23.0220) partial mRNA. XM\_001465662; marcador ER
- 3- *Leishmania infantum* JPCM5 hypothetical protein, conserved (LinJ17.1000) partial mRNA. XM\_001464719, marcador HPC(LJ17)
- 4- *Leishmania infantum* JPCM5 hypothetical protein (LinJ31.1310) partial mRNA. XM\_001467352, marcador HP(LJ31)
- 5- *Leishmania infantum* JPCM5 hypothetical protein (LinJ32.3980) partial mRNA. XM\_001467998, marcador HP(LJ32)

Para a determinação da viabilidade dos parasitas no interior dos ectoparasitas, o cDNA foi testado com os marcadores para PCR convencional PRP, ER, HPC(LJ17), HP(LJ31) e HP(LJ32), e RV1-RV2, que amplificam diferentes regiões do DNA de *L. (L.) infantum chagasi*.

Marcadores moleculares	5´- 3´
PRP-F	CGC GCA AGC AGA AGA TCC ACA ACC
PRP-R	TCC ATG AAC TGC GGC TTG TCC
ER-F	AAC ATG GTC TAC GTC TCC GGC CAG
ER-R	TTC ACG TAG CAG CGC ACC ATC
HPC(LJ17)-F	TTC CAT GTT TGC ACG AAC GAG T
HPC(LJ17)-R	CCT CAG TTC CCA TCA TGC GAG T
HP(LJ31)-F	ATG CAG CTG CTG ATT GTC G
HP(LJ31)-R	CAG GTG CAG CTC ATC AGG
HP(LJ32)-F	CGC ACT ACA GTT GTT GGA CCT CGT
HP(LJ32)-R	TGA CAT CTG CCC ACC CGA T

**Tabela 1:** Marcadores moleculares de regiões específicas do mRNA de *L. (L.) infantum chagasi*.

### **3.5.4. Eletroforese e gel de agarose.**

Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose 2% em TBE (0,045M de Tris-Borato; 0,001M EDTA) com 0,5 µl/ml de brometo de etídio e separados por um sistema de eletroforese horizontal numa cuba contendo o mesmo tampão. Os géis foram visualizados e fotografados, e as imagens adquiridas em transluminador GeneGenius (Programa Gel Capture, Mini Bis Pro, versão 4.5.3).

### **3.6. PCR em tempo real.**

#### **3.6.1. Extração de DNA controle para confecção de curva padrão.**

Para a construção da curva padrão de DNA foram utilizados promastigotas contadas em câmara de Neubauer e diluídas até a concentração de  $1 \times 10^8$  parasitas. Os parasitas foram diluídos em série para obter os pontos da curva padrão, variando a concentração de  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^2$  parasitas. As diversas concentrações foram centrifugadas e os sedimentos dissolvidos em uma solução contendo 10 mM Tris-HCl pH8,0; 10 mM EDTA; 0,5% SDS; 0,01% N-laurilsarcozyl; 100 µg/mL de proteinase K. Foram misturados e incubados a 56°C até completa lise. O DNA foi extraído usando o Purelink Genomic DNA kit (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os pontos da curva foram testados em triplicata.

#### **3.6.2. PCR em tempo real single.**

O marcador molecular HP(LJ31) foi selecionado para a construção de um marcador para PCR em tempo real (LinJ31), devido a sua melhor performance e boa visualização no gel de agarose. Os marcadores foram desenhados no programa Primer Express Software v3.0 (Applied Biosystems).

Para a PCR em tempo real foram utilizados sondas de hidrólise do

tipo TaqMan, duplamente marcadas. Na extremidade 5`-end foi ligado covalentemente um fluoróforo FAM (6-carboxy-fluorescein). Na extremidade 3`end, foi ligado um “quencher” NFQ (non-fluorescent quencher). O desenho das sequências foi: LINJ31F: 5`CCG CGT GCC TGT CG3`; LINJ31R 5` CCC ACA CAA GCG GGA ACT3` e a sonda TaqMan 5`CCTCCTTGGACTTTGC3`. As reações foram realizadas em um ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems), em um volume final de 20µL por reação. O volume de 3µL de DNA ou cDNA (amostras ou controles) foram adicionadas a um reagente contendo 10 µL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (NoAmpliErase UNG) e 1µL de uma mistura que inclui os marcadores forward e o reverse na concentração de 18µM, e a sonda TaqMan, marcada com FAM e usando NFQ como quencher na concentração de 5µM. foram adicionados as reações dois controles negativos e um controle positivos, assim como realizados na PCR convencional. As amplificações ocorreram em um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos para melhor atividade da AmpliErase UNG, uma enzima que remove qualquer produto amplificado anteriormente, evitando contaminação cruzada. A segunda etapa foi um ciclo a 95°C por 10 minutos. Na próxima etapa foram realizados 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto.

### **3.6.3. Reações de sequenciamento**

Os produtos amplificados na PCR convencional foram previamente purificados utilizando o StrataPrep PCR Purification Kit (Agilent Technologies) conforme instruções do fabricante. Os fragmentos foram sequenciados usando os marcadores moleculares forward e reverse que amplificam as sequências codificadas pelos marcadores HP(LJ31). Os sequenciamentos foram realizado usando o ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit e foram purificadas com o DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen). A reação de eletroforese foi realizada no ABI 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems). As sequências dos nucleotídeos foram analisadas e montadas manualmente, o alinhamento foi realizado utilizando o software Seqman Pro V.8 (Dnastar Lasergene). As sequências foram

comparadas com as sequências já depositadas no GenBank no site BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> )

#### 3.6.4. PCR em tempo real multiplex.

PCR em tempo real multiplex foi inicialmente desenhada no programa Primer Express Software v3.0 (Applied Biosystems) utilizando regiões conservadas e variáveis de espécies de *Leishmania* relacionadas ao subgênero. Para a identificação do gênero *Leishmania spp.* foram desenhados marcadores moleculares com sondas de hidrolise do tipo TaqMan baseados na região 18S, a saber: LEISH18S729F, 3'TTG CAG CCC GTG AAC ATT C'5; LEISH18S795R, 3'ACA TGC GTA AAT CAG GAA AGG AA'5; e a sonda LEISH18S7448pb, 5'AA GAA ACA AGA AAC ACG GGA G'3 marcada com o fluoróforo CY-5. Os marcadores moleculares para discriminar subgênero *Viannia* e complexo *L. donovani* foram desenhados a partir de sequências da actina da *Leishmania*, uma proteína do citoesqueleto com considerável diferença entre as espécies (Peacock et al, 2007).

Para o subgênero *Viannia* foram desenhados os seguintes marcadores moleculares a partir da região da actina da espécie *L. (V.) braziliensis* (Accession number: XM\_001561757), a saber: LVIAN36ACTF, 3'CAA GTG CGA CAT TGA TGT GCG A'5; LVIAN122ACTR 3'CGC TCC GGC AGA TKT C'5, e a sonda TaqMan marcada com o fluoróforo FAM, LVIAN78ACTpb 5'AG TAG AGC CGC CAG ACA GGA CA3'. Para a identificação das espécies do Complexo *L. donovani*, foram desenhados os seguintes marcadores a partir da região da actina da espécie *L.(L.) infantum* (Accession number: XM\_001462926), a saber: LDON37ACTF, 3'AAG TGC GAC ATT GAT GTG CGC'5; LDON114ACTR 3'AAG GTT GAG GAA CAT GGT CGA C'5 e a sonda de hidrolise TaqMan marcada com o fluoróforo HEX; LDON66ACTPB, 5'CC GGA CAG CAC GAT GTT CCC GTA C3'.

As reações foram realizadas em um ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) em um volume final de 20µL por reação. O volume de 3µL de DNA (amostras ou controles) foi adicionado a um reagente contendo

10  $\mu$ L de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (NoAmpliErase UNG). Foram ainda adicionados 1 $\mu$ L de uma mistura dos marcadores LEISH18S729F e LEISH18S795R na concentração de 18 $\mu$ M, e a sonda TaqMan LEISH18S7448pb, na concentração de 5 $\mu$ M, 1 $\mu$ L de uma mistura dos marcadores LVIAN36ACTF e LVIAN122ACTR na concentração de 18 $\mu$ M, e a sonda TaqMan LVIAN78ACTpb, na concentração de 5 $\mu$ M, e 1 $\mu$ L dos marcadores LDON37ACTF e LDON114ACTR na concentração de 18 $\mu$ M, e a sonda TaqMan LDON66ACTPB, concentração de 5 $\mu$ M.

A cada ciclo de amplificação foram incluídos dois controles negativos e um controle positivo e ocorreu em um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos para melhor atividade da AmpliErase UNG, uma enzima que remove qualquer produto amplificado anteriormente, evitando contaminação cruzada. A segunda etapa foi um ciclo a 95°C por 10 minutos. Na próxima etapa foram realizados 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto.

## **4- Resultados**

**Objetivo 1- Padronizar a extração de DNA e RNA de *Leishmania* em sangue de animais infectados ingerido por carrapatos e pulgas, investigando a possível transmissão da leishmaniose visceral por ectoparasitas de cães.**

### **4.1. Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico laboratorial foi realizado pelos métodos de ELISA e por PCR. Dos 73 cães provenientes da cidade de Mirandópolis, 60 deles apresentaram resultados positivos para leishmaniose pelos dois métodos, além de apresentarem sinais clínicos da doença.

### **4.2. Pesquisa direta de *L. (L.) infantum chagasi* em carrapatos.**

Entre os carrapatos recebidos, alguns foram separados e analisados logo na chegada ao laboratório, ou seja, 7 a 10 dias após a data da remoção dos ectoparasitas dos cães. O conteúdo intestinal e hemolinfa dos carrapatos foram obtidos para análise por punção no abdome, e a retirada da porção distal de uma ou mais patas, respectivamente. Foram analisados cerca de 40 lâminas para a pesquisa de formas sugestivas de *L.(L.) infantum chagasi*. Cerca de 10 pulgas também foram analisadas em lâminas pelo exame direto e analisadas novamente após coloração.

Não foi encontrada nenhuma forma sugestiva do parasita na pesquisa direta no conteúdo intestinal e hemolinfa dos carrapatos ou nas pulgas.

### **4.3. Frequência de infestação dos carrapatos e pulgas nos cães.**

Para se avaliar a frequência de infestação, os ectoparasitas foram separados de acordo com a taxonomia. Esta separação permitiu testar vários estádios e os gêneros separadamente.

A presença de anticorpos anti-*Leishmania* verificados por ELISA, e de DNA de *L. (L.) infantum chagasi* encontrados pela PCR convencional indicaram que 60 cães (82,2%) entre os 73 do estudo foram positivos para leishmaniose visceral canina. Os cães estavam infestados por carrapatos e pulgas, variando em número de 10 a 50 por animal. Dos 73 animais, quarenta apresentavam pulgas e, 32 deles tinham leishmaniose. Carrapatos ninfas foram encontrados em 24 cães dos quais 18 estavam infectados. Machos adultos estavam presentes em 41 cães, dos quais 34 eram positivos para leishmaniose. As fêmeas estavam presentes em 46 cães (63%), dos quais 39 eram positivos para leishmaniose (**Tabela 2**).

Também foi estudada a prevalência de *L. (L.) infantum chagasi* em carrapatos e pulgas coletados dos cães com leishmaniose visceral canina. Dos 60 cães com diagnóstico positivo, 12 albergavam ectoparasitas negativos para *L. (L.) infantum chagasi*. Os outros 48 cães (80%) apresentavam ectoparasitas positivos, entre eles, 17 (53,1%) tinham pulgas positivas, 14 (77,7%) carrapatos ninfas, 20 (58,8%) fêmeas adultas e 30 (76,9%) machos adultos. Nenhum carrapato ou pulga coletado dos 13 cães sem leishmaniose visceral canina estava infectado com *L. (L.) infantum chagasi*. Estes dados estão mostrados na **Tabela 3**.

Ectoparasitas	Número de cães analisados			Infestação (%)
	Com leishmaniose (60) <sup>a</sup>	Sem leishmaniose (13)	Total (73)	
Pulgas	32	08	40	55
Carrapatos				
Ninfas	18	06	24	33
Machos adultos	34	07	41	56
Fêmeas Adultas	39	07	46	63

<sup>a</sup> LVA foi determinada por ELISA e PCR.

**Tabela 2:** Frequência da infestação de pulgas e carrapatos encontrado nos cães com e sem leishmaniose provenientes da cidade de Mirandópolis.

Prevalência encontrada nos ectoparasitas para *L. (L.) infantum chagasi*

Ectoparasitas <sup>a</sup>	PCR <sup>b</sup>		Positividade (%)
	Neg	Pos	
<i>Pulgas</i>	15	17	53.1
<i>Carrapatos</i>			
Ninfas	04	14	77.7
Machos adultos	14	20	58.8
Fêmeas adultas	09	30	76.9

<sup>a</sup> Pool de 3 a 5 carrapatos e pulgas por cão foram macerados e homogeneizados para a extração do DNA.

<sup>b</sup> Número de cães infestados com ectoparasitas positivos (Pos) e negativos (Neg) para *L. (L.) infantum chagasi*. Primers RV1/RV2

**Tabela 3:** Prevalência de *L. (L.) infantum chagasi* em carrapatos e pulgas, retirados de cães com LVA.

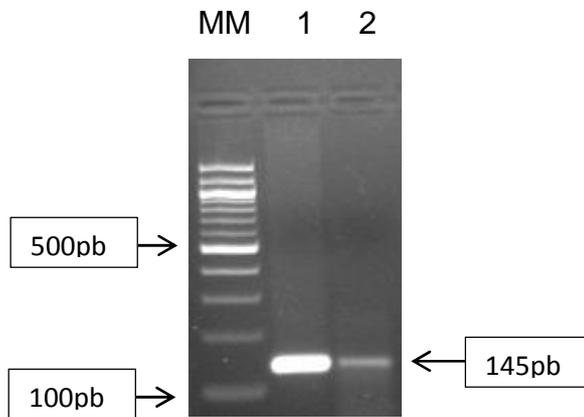
#### 4.4. PCR convencional

Após a extração de DNA a PCR convencional foi realizada para determinar gênero (marcador molecular 150/152), uma região específica do complexo *L. (L.) donovani* (RV1/RV2) e um controle endógeno da reação (GAPDH). Embora as extrações de material genético tenham sido realizadas pela metodologia de Sambrook modificada (Gomes et al., 2007) e por kits comerciais, nenhuma diferença foi observada quanto a qualidade e integridade do DNA extraído. As extrações de RNA foram realizadas unicamente por kits comerciais. Todo material genético foi dosado no Nanodrop, obtendo uma razão igual ou maior a 1,8; significando uma amostra relativamente livre de proteínas e contaminantes. A extração de RNA foi método de escolha para os ectoparasitas, pois além de detectar a presença do parasita, também seria capaz de avaliar a sua viabilidade.

Após as primeiras análises, a próxima etapa do trabalho realizada foi a escolha de marcadores 150/152 para determinar o gênero (Passos, et al, 1999), de marcadores para *L. (L.) infantum chagasi* RV1/RV2 (Ravel et al., 1995), e de um marcador Gapdh-4 para se verificar a integridade do material genético extraído (Kullberg et al., 2006). Primeiramente foram analisados o DNA extraído de fragmentos de linfonodo dos 73 cães da cidade de Mirandópolis, utilizando os marcadores 150/152 e RV1/RV2, confirmando os resultados positivos obtidos pela sorologia (ELISA) em 60 animais. A qualidade da extração foi confirmada pela positividade nas amostras dos 73 cães quando utilizado o marcador Gapdh-4. Todos os 60 cães foram positivos para os marcadores 150/152 e RV1/RV2. Nenhuma amostra testada foi negativa para o marcador molecular canino Gapdh-4, demonstrando uma boa qualidade de extração e integridade do material genético.

A viabilidade dos parasitas no interior dos ectoparasitas foi determinada pela extração de DNA e RNA seguida da PCR. A Figura 2 mostra os produtos amplificados dos marcadores. Um teste com os marcadores RV1/RV2 utilizando DNA e cDNA extraído de dois “pools” de

carrapatos retirados de um mesmo cão com leishmaniose visceral canina. Ambos os produtos foram amplificados sugerindo que os parasitas extraídos da amostra de RNA permanecem viáveis no interior dos carrapatos.



**Figura 2:** Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio de produtos amplificados a partir de DNA (1) e cDNA (2) extraídos de carrapatos fêmeas retirados de um mesmo cão com leishmaniose visceral. MM, 100-bp ladder. Foi utilizado na reação o primer RV1/RV2 que amplifica um fragmento de 145pb)

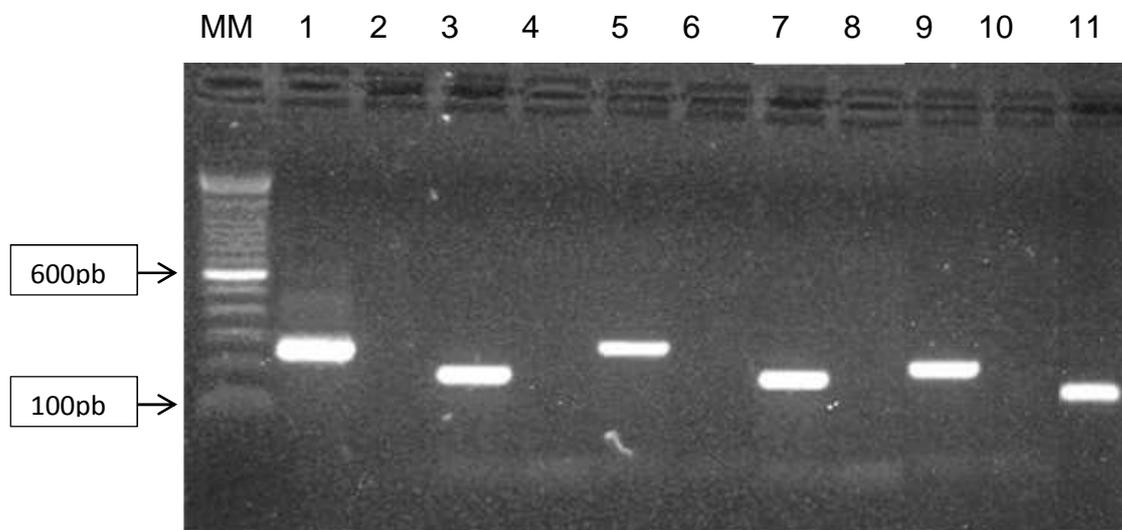
#### 4.5. Padronização dos marcadores moleculares

O passo seguinte foi escolher marcadores moleculares sensíveis e específicos para detectar *L. (L.) infantum chagasi* por PCR em tempo real. Os marcadores moleculares PRP, ER, HPC(LJ17), HP(LJ31) e HP(LJ32), foram padronizados em reações de gradiente para estabelecer as temperaturas de anelamento, onde foi determinada a de 60°C.

Todos produtos de DNA foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 2%. Os géis foram corados por brometo de etídio, visualizados e analisados em transiluminador de ultravioleta. A documentação foi realizada por digitalização.

A seguir foram testadas as amostras de DNA e os controles positivo e negativo. Todos os cinco marcadores moleculares foram capazes de

amplificar DNA de *L.(L.) infantum chagasi* utilizados na PCR convencional. As amostras utilizadas neste experimento foram extraídas de um pool de ectoparasitas como mostrado na **Figura 3**.



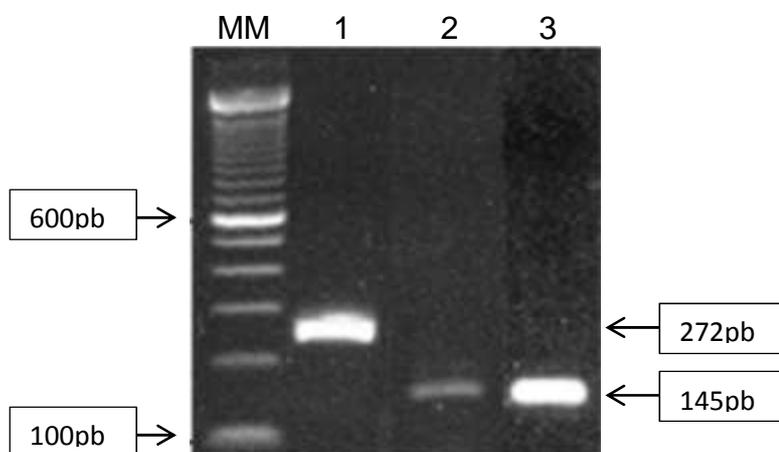
**Figura 3:** Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados de DNA de um pool de carrapatos fêmeas retirados de um cão infectado. MM, 100-bp ladder; coluna 1 marcador PRP; coluna 3 marcador ER; coluna 5 marcador HPC(LJ17); coluna 7 marcador HP(LJ31); coluna 9 marcador HP(LJ32). Colunas 2, 4, 6, 8 e 10 controles negativos. Coluna 11 controle positivo com marcador RV1/RV2.

A região do HP(LJ31) foi escolhida para o desenho do marcador molecular para a construção de um marcador para PCR em tempo real por apresentar melhores resultados em maior número de amostras.

#### **4.6. Amostras de ectoparasitas para teste de viabilidade do parasita.**

Após a etapa da padronização dos marcadores moleculares e da reação foi levantada a hipótese se os parasitas causadores da leishmaniose conseguiriam sobreviver no interior dos ectoparasitas por tempo maior que dez dias e ainda, se conseguiriam permanecer vivos após a mudança de estágio evolutivo. Como alguns carrapatos ninfas chegaram vivos ao laboratório, os espécimes foram acondicionados em placa de Petri durante alguns dias para que ocorresse a mudança de estágio de ninfas para

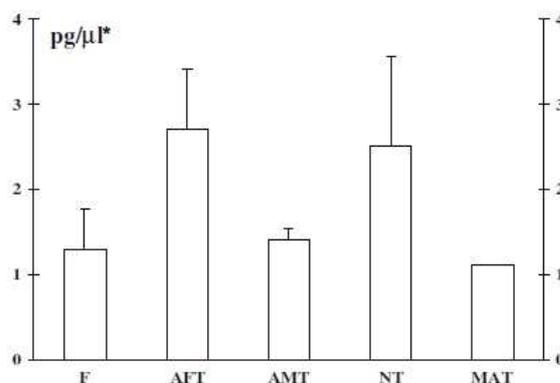
adultos. Após a muda, o material genético desses carrapatos foi extraído, purificado e testado com os 5 marcadores moleculares PRP, ER, HPC(LJ17), HP(LJ31) e HP(LJ32). O marcador RV1/RV2 foi utilizado nesta reação como marcador de controle para assegurar que a amplificação era realmente resultante de material genético de *L. (L.) infantum chagasi*. O resultado foi positivo para o marcador PRP e para o RV1/RV2, como mostrado na Figura 4. Sendo que o marcador PRP, que amplifica um produto de 272pb de uma proteína paraflagelar de *L. (L.) infantum*, teve uma maior amplificação e maior resolução no gel devido ter sido desenhado a partir de uma região específica do mRNA.



**Figura 4:** Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados utilizando amostra de cDNA de pool de carrapatos adultos após a mudança de estágio. MM, 100-bp ladder; coluna 1, PRP; coluna 2, RV1-RV2; coluna 3, RV1-RV2 (controle positivo).

Também foi realizada a quantificação de mRNA de *Leishmania* presente nos ectoparasitas. Com a padronização do método, foi possível quantificar as concentrações de mRNA nos grupos de ectoparasitas. Todos os grupos foram compostos de cinco exemplares por grupo, e a PCR em tempo real quantificou  $1.3 \pm 0.47$ ,  $2.7 \pm 0.7$ ,  $1.4 \pm 0.15$ , e  $2.5 \pm 1.04$  pg/ $\mu$ l nos grupos de pulgas, fêmeas adultas, machos adultos e carrapatos ninfas, respectivamente. Estes dados estão representados na **Figura 5**.

Um único exemplar de carrapato adulto pertencente ao grupo, o qual ocorreu a mudança de estágio evolutivo apresentou a concentração de 1.1 pg/ $\mu$ L.



**Figura 5:** Quantificação das concentrações de mRNA de grupos de pulgas(F=  $1.3 \pm 0.47$ ), carrapatos adultos fêmeas(AFT=  $2.7 \pm 0.7$ ), carrapatos adultos machos (AMT=  $1.4 \pm 0.15$ ), carrapatos ninfas (NT=  $2.5 \pm 1.04$ ) e ninfas recente mudadas (MAT= 1.1), em pg/μL.

#### 4.7. Reação de sequenciamento.

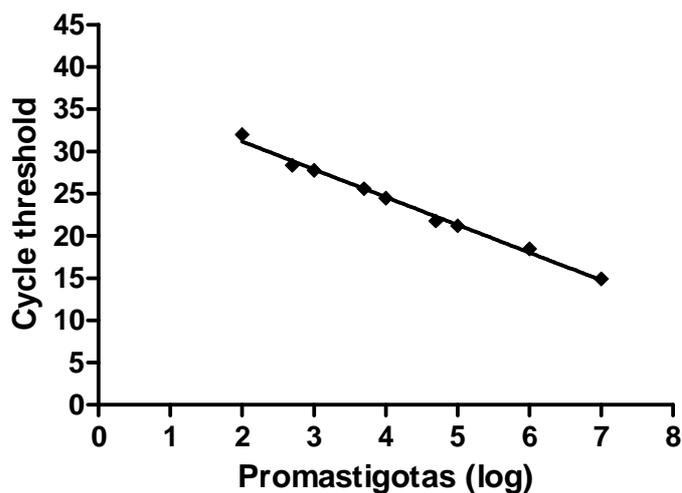
Após a amplificação das amostras de DNA extraído de cães e de mRNA extraído dos carrapatos foi realizada uma reação de sequenciamento utilizando os marcadores moleculares HP(LJ31), em reações separadas forward e reverse. Os resultados foram comparados a seqüências genéticas depositadas no Genbank, apresentando total identidade com *L. (L.) infantum chagasi* ( acesso XM\_001467352).

**Objetivo 2- Padronizar a reação em cadeia da polimerase em tempo real para o diagnóstico molecular das leishmanioses.**

#### **4.8. Determinação do limite de detecção**

Para determinar o comportamento da reação e o limite de detecção foi realizada com uma curva padrão em diluições seriadas de DNA proveniente de formas promastigotas em cultura de uma cepa padrão de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/LD/strain 46) e os pontos da curva variaram entre concentrações de  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^2$  promastigotas. Os “Cycle Threshold” ( $C_T$ ) obtidos foram plotados contra as diferentes concentrações de parasitas. O número de parasitas foi calculado pelo valor do  $C_T$ , pela equação de regressão linear,  $y=ax+b$ , onde:  $y = C_T$ ;  $a$  = inclinação da curva (slope);  $x$ = número de parasitas;  $b$ = onde a curva intercepta o eixo do  $y$  ( $y$  intercept).

Deste modo foi possível estimar o número de parasitas presentes em cada amostra como mostra na **Figura 6**, a curva apresentou ótima linearidade e reprodutibilidade, sendo o seu  $R^2= 0,9933$  indicando grande correlação entre as variáveis. Foi determinado o limite de detecção da curva correspondendo ao  $C_T$  de 37.74.



**Figura 6:** Curva padrão obtida do log das diluições seriadas de DNA de *L. (L.) infantum chagasi* e seus respectivos valores de  $C_T$ .

#### 4.9. Padronização da PCR em tempo real “single”.

A sensibilidade da PCR em tempo real foi determinada após análise de 202 amostras de DNA extraído de cães que foram divididas em três grupos. Como controles foram adicionados o Grupo IV e o Grupo V. Os dados podem ser visualizados na figura 7.

Grupo I: todas as 99 amostras de cães com diagnóstico clínico, sorológico e molecular positivo (150/152 e RV1/RV2) para *L. (L.) infantum chagasi* apresentaram resultados positivos também na PCR em tempo real. Os valores do  $C_T$  variaram entre 17.20 - 36.86, tendo como média 27.52.

Grupo II: das amostras dos 96 cães com diagnóstico clínico, sorológico e molecular negativos para *L. (L.) infantum chagasi*. Noventa e duas amostras (95,8%) foram negativas para o marcador LinJ31 e quatro amostras foram positivas (4,2%). Entre as amostras negativas os  $C_T$  variaram entre 34.47 – 36.31, tendo como média 35.68.

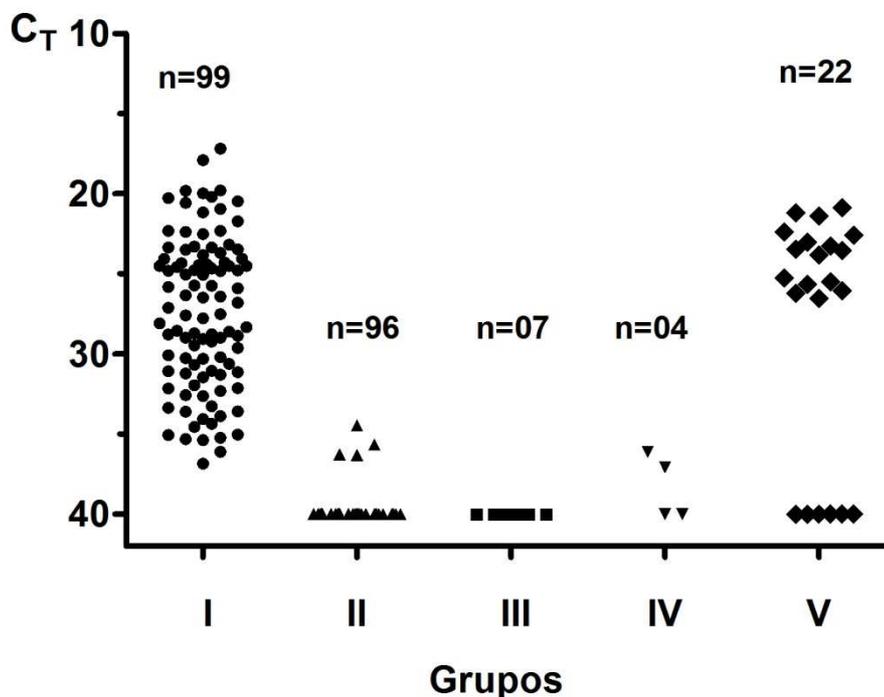
Grupo III: entre as sete amostras caninas positivas para *L. (V.) braziliensis*, todas foram negativas.

Grupo IV: as duas amostras de *Trypanosoma cruzi* analisadas foram negativas, porém as amostras de *L. (L.) amazonensis* foram positivas com  $C_T$  de 36.02 e 37.07.

Grupo V: 22 cepas padrão de *Leishmania* da Organização Mundial da Saúde (OMS) foram analisadas. As dezesseis cepas padrões utilizadas resultaram em um PCR em tempo real positivo foram: *L.(L.) mexicana* (MNYC/BZ/1962/M379), *L.(L.) mexicana* (MHON/BZ/1982/BEL21), *L.(L.) mexicana* (MORY/PA/86/GML), *L.(L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), *L.(L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L.(L.) donovani* (MHOM/ET/1967/HU3), *L.(L.) donovani* (MHOM/IN/1980/DD8), *L.(L.) chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75), *L.(L.) infantum* (MHOM/TN/1980/LEM235), *L.(L.) major* (MRHO/SU/59/P-strain), *L.(L.) major* (MHOM/SU/1973/5-ASKH), *L.(L.) major* (MHOM/IL/1967/JERICHOII), *L.(L.) tropica* (MHOM/SU/1974/K27), *L.(L.) tropica* (MHOM/SU/1958/STRAIN OD), *L. (L.) aethiopica* (MHOM/ET/1972/L100) e *L.(L.) pifanoi*

(MHOM/VE/1957/LL1). As seis cepas padrão que resultaram em um resultado negativo na PCR em tempo real foram: *L.(V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L.(V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L.(V.) panamensis* (MHOM/PA/1971/LS94), *L. hertigi* (MCOE/PA/1965/C8), *L. henrietti* (MCAV/BR/1945/L88) e *L. gerbilli* (MRHO/CN/1960/GERBILLI).

Este teste de especificidade do marcador LinJ31 com as cepas OMS, foi realizado no laboratório de biologia molecular do Centers for Disease Control and Prevention (CDC) em Atlanta nos Estados Unidos da América.



**Figura 7:** Padronização da PCR em tempo real com o marcador LinJ31 com amostras de DNA e cepas padrão com seus respectivos valores de  $C_T$ . ( $C_T=40$  significa amostra negativa). Grupo I: amostras de cães positivos para *L. (L.) infantum chagasi*; Grupo II: amostras de cães negativos para *L. (L.) infantum chagasi*; Grupo III: amostras de cães positivas para *L. (V.) braziliensis*; Grupo IV: amostras de *T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis*; Grupo V: cepas padrão OMS de diversas espécies de *Leishmania*.

**Objetivo 3: Padronizar PCR Multiplex em tempo real para a diferenciação das espécies do subgênero *Leishmania* (complexo *L. donovani*), das espécies do subgênero *Viannia*.**

#### **4.10. Escolha dos marcadores moleculares.**

Os marcadores moleculares para a reação em tempo real multiplex foram idealizados a partir das seguintes regiões genicas: 1) 18S para identificação do gênero *Leishmania*, 2) actina para diferenciação entre as espécies do “complexo *Donovani*”, das espécies do subgênero *Viannia*. Cada conjunto de marcadores moleculares incluindo os primers forward, reverse e sonda foram testados separadamente e posteriormente em conjunto em uma reação multiplex.

Foram utilizadas 313 amostras sendo 220 isolados de *Leishmania* de diversas espécies e 93 amostras negativas para *Leishmania*, porém positivas para outros parasitas.

Dos 66 isolados positivos para espécies do subgênero *Viannia*, 59 (89,4%) foram positivas no marcador de gênero CY-5, e 60 (90,9%) amostras foram positivas no marcador FAM, específico para subgênero *Viannia*. Dos 110 isolados de *Leishmania* do complexo *Donovani*, 100 (90,9%) foram positivos no marcador de gênero e 94,5% (104 amostras) foram positivas no marcador HEX. Nenhuma amostra pertencente ao subgênero *Viannia* foi positiva no marcador HEX e nenhuma amostra pertencente ao complexo *Donovani* foi positiva no marcador FAM. As amostras das espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) major* apresentaram resultados positivos apenas no marcador de gênero. As outras espécies analisadas pertencentes ao subgênero *Leishmania*, como *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica*, apresentaram resultados positivos também para o marcador HEX. Os resultados podem ser observados no quadro 1.

As 93 amostras negativas para *Leishmania spp.* não apresentaram nenhum C<sub>T</sub> em nenhuma análise realizada.

Amostra de DNA	N° de Isolados	Cy5		HEX		FAM	
		Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Subgênero <i>Viannia</i> <sup>1</sup>	66	59	07	0	66	60	6
Complexo <i>donovani</i> <sup>2</sup>	110	100	10	104	6	0	110
<i>L. amazonensis</i>	10	10	0	0	10	0	10
<i>L. mexicana</i>	13	13	0	0	13	0	13
<i>L. major</i>	8	8	0	0	8	0	8
<i>L. tropica</i>	9	9	0	5	4	0	9
<i>L. aethiopica</i>	4	4	0	2	2	0	4
Negativas para <i>Leishmania spp.</i>	93	0	93	0	93	0	93

1. Compreende as espécies *L.(V.) guyanensis*, *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) panamensis*; 2 compreende as espécies *L.(L.) donovani*, *L.(L.) chagasi*, *L.(L.) infantum*.

Quadro 1: distribuição dos resultados da PCR multiplex por número de isolados positivos em cada marcador molecular, CY-5, HEX e FAM.

## 5. Discussão

A leishmaniose visceral tem aumentado em todo o mundo, principalmente devido a grande migração humana e de animais domésticos contribuindo para a dispersão da infecção por leishmania em áreas não endêmicas ou de baixa endemicidade. (Stuart et al. 2008; Aagaard-Hansen et al. 2010; WHO 2011b). A infecção canina é considerada uma infecção potencialmente fatal em regiões da Europa, África, Ásia e América do Sul. Na América do Sul milhões de cães estão infectados e em algumas regiões endêmicas a prevalência chega a variar entre 63 a 80% (Dantas-Torres, 2006; Dantas-Torres, 2007; Baneth et. al, 2008; MSB 2007). A ocorrência de *Lu. longipalpis* com baixas taxas de infecção por *Leishmania* já foram relatadas em diferentes áreas endêmicas no Brasil (Missawa e Dias, 2007; Michalsky et. Al, 2009; Savani et. Al, 2009). Situações semelhantes foram relatadas em outros países. A transmissão autóctone na ausência do vetor natural já foi relatada nos Estados Unidos, Canadá e Holanda (Diaz-Espineira & Slappendel, 1997; Gaskin et al. ,2002; Duprey et al., 2006).

A idéia inicial para este estudo partiu das observações dos dados de um estudo epidemiológico realizado por parte do nosso grupo de pesquisa no município de Mirandópolis, situada na região noroeste do Estado de São Paulo (Odorizzi et al, 2007a). Este estudo revelou uma elevada prevalência de LVA canina e uma baixa frequência de *Lu. longipalpis*. Estes resultados levaram a supor duas hipóteses: os animais se infectaram em um período anterior ao do estudo ou outros mecanismos de transmissão poderiam estar atuando. Desde 1999 a leishmaniose visceral canina vem avançando da região noroeste em direção ao centro do Estado. Contudo casos autóctones caninos foram relatados próximos a região metropolitana de São Paulo, nas cidades de Mogi das Cruzes, Cotia e Embu. A segunda hipótese foi reforçada com o aparecimento dos casos em regiões onde não foi detectada a presença do vetor. A suspeita de que outros artrópodes, além dos flebotomíneos, estivessem participando da transmissão da leishmaniose no Estado de São Paulo partiu da observação do aparecimento de casos

ocorrendo em locais onde não se encontram o mosquito vetor, juntamente com o alto índice de ectoparasitas encontrados nos cães infectados (Camargo-Neves, 2004, Camargo & Katz, 1999, CVE, 2011). Colaborando com a hipótese, os cães com LVA apresentavam um grande número de carrapatos e pulgas. Um ensaio preliminar mostrou que os carrapatos *R. sanguineus* coletados de cães com LVA (com PCR, ELISA e RIF positivos), apresentavam PCR positiva para *L. (L.) infantum chagasi*. Estes resultados preliminares nos levam a supor que os carrapatos que albergam *L. (L.) infantum chagasi* provavelmente foram infectados após o repasto sanguíneo em cães infectados.

Assim, a estratégia foi de desenhar um estudo prospectivo para avaliar a metodologia. A proposta foi determinar espécies de *Leishmania* em amostras biológicas caninas, analisar a eficácia da metodologia em diagnosticar a LVA e, ao mesmo tempo, distinguir *L. (L.) infantum chagasi* de outras espécies de *Leishmania*.

Ectoparasitas, como a pulga *C. felis felis* e o carrapato *R. sanguineus* tem alta frequência em cães, e já são conhecidos como transmissores de outros patógenos como fungos, bactérias e vírus, além de vermes e podem ser interpretados como vetor biológico ou hospedeiro intermediário (Linardi & Nagem, 1973; Fortes, 1997; Linardi & Guimarães, 2000).

Linardi & Nagem (1973) observaram que as espécies de ectoparasitos com maior frequência na infestação em cães da região metropolitana de Belo Horizonte foram *Ctenocephalides felis felis* (87%), *Pulex irritans* (60,28%) e *Rhipicephalus sanguineus* (32%). A frequência de infestação encontrada neste trabalho esta de acordo com resultados anteriormente encontrados (Linardi & Nagem, 1973), apresentando cães com altos níveis de infestação por pulgas (55%), e uma infestação de carrapatos variando entre 33 e 63%.

Pulgas da espécie *C. felis felis* e carrapatos *R. sanguineus* já foram encontradas albergando tripanosomatídeos dos gêneros *Leptomonas* spp e

*Blastocithidia christophersi* respectivamente (Coutinho, 2003). No Brasil, já foram encontradas formas de flagelados morfologicamente semelhantes a *Leishmania*, indicando que eles não somente podem se manter, mas também podem se desenvolver no tubo digestivo de carrapatos (Sherlock, 1964).

Esses trabalhos realizados por Coutinho et al. (2005) com *R. sanguineus* e Coutinho & Linardi (2007) com *C. felis felis* mostraram que 1,9% dos esfregaços produzidos a partir de pulgas dessa espécie retiradas de animais naturalmente infectados por *L. (L.) infantum chagasi* apresentaram promastigotas de tripanosomatídeo, porém nenhuma forma foi encontrada nos esfregaços dos carrapatos. No nosso estudo foram analisadas cerca de 50 lâminas, primeiramente à fresco e novamente observadas após a coloração, de material do conteúdo estomacal e hemolinfa de carrapatos, e de pulgas não sendo encontrada nenhuma forma sugestiva de *L. (L.) infantum chagasi*. A não observação de formas sugestivas de protozoários em microscopia óptica vai de encontro aos achados no estudo de Coutinho (2005), porém vão contra os achados de Coutinho e Linardi (2007). O fato de não ser encontrado nenhuma forma sugestiva de tripanosomatídeo no presente estudo, pode ser devido à baixa sensibilidade da técnica, e ao grande volume do sangue ingerido pelos ectoparasitas, aumentando assim a dificuldade da visualização.

Dos 73 cães analisados da cidade de Mirandópolis, 60 foram positivos no teste de ELISA e na PCR, confirmando o diagnóstico clínico, e 13 foram negativos na sorologia embora todos os cães tivessem sinais e sintomas compatíveis com o quadro de LVA.

A prevalência de *L. (L.) infantum chagasi* nos carrapatos e pulgas foi avaliada pela PCR sendo que 80% dos cães (48 animais) apresentaram ao menos um estágio de carrapato positivo, sendo ninfas (77,7%), carrapatos machos (58,8%), carrapatos fêmeas (76,9%) e, dezessete cães apresentaram pulgas positivas (53,1%). Estes índices de positividade são bastante relevantes, visto que a taxa de positividade normalmente

encontrada em flebotomíneos em áreas endêmicas fica abaixo de 1% (Missawa and Dias 2007; Michalsky et al. 2009; Savani et al. 2009). Essa alta taxa de infecção dos ectoparasitas encontrados no nosso estudo pode estar relacionada ao habitat do ectoparasita que vive em contato direto com a pele dos cães, diferentemente dos flebotomíneos que mantem apenas um contato ocasional com a pele do cão. No entanto *Leishmania* pode estar se adaptando a outros vetores independente da ocorrência ou não do vetor natural (Camargo-Neves, 2004; Dantas-Torres et al, 2005; Costa et al, 2007; Odorizzi et al, 2007b). Além dos nossos dados serem consistentes com outros estudos (Coutinho et al, 2005; Coutinho & Linardi, 2007; Ferreira et al, 2009; Paz et al, 2010), os dados também indicam uma maior taxa de infecção em carrapatos e pulgas por *L(L.) infantum chagasi*, em comparação as taxas encontradas nos flebotomíneos.

Em outros estudos, os resultados das análises de DNA por PCR para *Leishmania* spp obtidos de ectoparasitos retirados, também, de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum chagasi* foram positivos em 29,9% das pulgas e 15,4% dos carrapatos. Nestes estudos, ainda, foram realizadas inoculações por via peritoneal e oral de macerados de pulgas e carrapatos em hamsters. Tendo como resultado, PCR positiva para os macerados de *C. felis felis* em 77% dos animais inoculados por via intraperitoneal e 23% para os animais que receberam o macerado por via oral. O grupo dos hamsters que recebeu o macerado de *R. sanguineus* apresentou PCR positiva para *Leishmania* spp em 81% dos animais cujas inoculações foram via intraperitoneal e 29,4% dos animais que receberam o macerado por via oral. No entanto permaneceu a dúvida quanto ao agente etiológico, pois a PCR poderia dar reação cruzada entre *Leishmania* spp e *Leptomona* spp, que são parasitas naturais destes ectoparasitos (Coutinho et al. 2005; Coutinho & Linardi 2007).

A alta positividade encontrada nos cães (82,2%) era esperada devido a coleta ter sido realizada em uma região em franca expansão da leishmaniose visceral canina, apresentando muitos casos por ano. A

ocorrência de *Lu. longipalpis* geralmente é baixa na região durante certas estações do ano (Odorizzi et al, 2007a; CVE, 2011), e a maioria dos animais estudados estava infestada com um grande número de pulgas e carrapatos. As pulgas foram coletadas em 55% dos 73 cães estudados. As ninfas foram encontradas em 33% dos animais, os carrapatos machos em 56% e os carrapatos fêmeas foram encontrados em 63%.

Para demonstrar a presença e a viabilidade dos parasitas no interior dos carrapatos, foram extraídos DNA e RNA separadamente de pools de carrapatos de um mesmo cachorro com sorologia e PCR positivos para LVA e testados com os marcadores RV1/RV2. Ambos foram positivos confirmando assim as suspeitas que os parasitas se encontram vivos e em divisão celular dentro dos ectoparasitas. A hipótese que os parasitas permaneciam viáveis dentro dos ectoparasitas já havia sido amplamente discutida (Blanc & Caminopetros, 1930; Giraud et al. 1954; Sherlock, 1964), porém somente agora com o advento da biologia molecular foi possível detectar RNA no interior de ectoparasitas. Como o encontro de DNA poderia somente detectar a presença no parasita, o RNA foi utilizado para a quantificação de parasitas vivos, pois o DNA de parasitas de *L.(L.) donovani* pode permanecer intacto por longos períodos, alguns datando mais de 4000 mil anos (Kupfer et al., 2006).

Como a ocorrência da *L(L.) infantum chagasi* em carrapatos e pulgas era esperada devido ao hábitos alimentares, parte deste estudo se direcionou a investigar se os parasitas permaneceriam viáveis dentro dos carrapatos. Estas descobertas, juntamente com um estudo recente que detectou kDNA de leishmania nas glândulas salivares de *R. sanguineus* (Dantas-Torres et al, 2010, Dantas-Torres et al, 2010b) sugerem que durante a alimentação, os carrapatos poderiam estar liberando parasitas vivos, já que eles excretam uma grande quantidade de líquidos durante a alimentação. A presença e a alta prevalência de *L(L.) infantum chagasi* viáveis em carrapatos e pulgas sugerem a possível importância dos ectoparasitas na disseminação da LVA, porém estes resultados não

demonstram conclusivamente se estes ectoparasitas podem atuar como vetores da LVA.

O próximo passo foi a investigação se *Leishmania* ingerida pelos ectoparasitas seriam capazes de sobreviver por longos períodos no interior dos espécimes e manterem-se vivos após a muda do hospedeiro. A amplificação positiva com os marcadores PRP e RV1/RV2, de material extraído de carrapatos sugerem a capacidade de preservar parasitas vivos após a ecdise de ninfa para o estágio adulto. As concentrações de cDNA foram quantificadas em grupos de cinco exemplares apresentando quantidades significativas de material genético, comprovando a presença e a viabilidade dos parasitas em todas os estádios evolutivos dos carrapatos e nas pulgas.

A transmissão de um patógeno por meio de um carrapato é determinada por variáveis fisiológicas e ecológicas relacionadas ao vetor. Para se atingir o status de vetor de um patógeno, o hospedeiro tem que ter competência e capacidade vetorial. A competência vetorial diz respeito ao ectoparasita se tornar infectado com um patógeno e transmitir para um hospedeiro susceptível, podendo ou não infectar sua prole por transmissão transovariana. A capacidade vetorial é o número e a eficiência de transmissões baseada em diversos fatores como a preferência de um determinado hospedeiro, taxa de picadas ou alimentação por dia, ciclo gonotrópico, ou seja, o tempo entre a ingestão do sangue e a postura dos ovos; densidade de hospedeiros, longevidade dos vetores e fatores climáticos (Mehlhorn, 2008).

Para serem considerados vetores os carrapatos, além da transmissão transovariana (Dantas-Torres et al., 2010b) devem ingerir uma quantidade suficiente de parasitas para o patógeno se estabelecer, deve ainda ser capaz de manter a infecção entre os estádios, inclusive após a ecdise (Colombo et al, 2011), e ser capaz de transmitir uma quantidade suficiente de parasitas que seja capaz de infectar um hospedeiro.

O próximo passo foi a escolha de cinco regiões específicas do mRNA de *L. (L.) infantum chagasi*. Foram escolhidas regiões mais conservadas evolutivamente para o desenho de cinco novos marcadores, a saber: PRP, ER, HPC(LJ17), HP(LJ31) e HP(LJ32). Todos os marcadores obtiveram os melhores desempenhos na temperatura de 60°C quando testados com DNA controle, extraído de cultura de *L. L. infantum chagasi*. Porém, quando testados com DNA extraído de cães e de ectoparasitas, somente uma, HP(LJ31), demonstrou uma amplificação eficiente sendo positiva com todas as amostras testadas. As amostras positivas com o marcador HP(LJ31) foram sequenciadas. O objetivo do sequenciamento dos produtos amplificados foi de confirmar a especificidade dos marcadores desenhados. Com a total identidade apresentada pelo marcador HP(LJ31) com seqüências de *L. (L.) infantum chagasi* depositadas no GenBank, foi dado prosseguimento ao projeto no sentido do desenho e construção dos marcadores da PCR em tempo real.

Após a demonstração de Wirth & Pratt (1982) relatando não haver hibridização cruzada entre os complexos *L. braziliensis* e *L. mexicana*, diversos pesquisadores desenvolveram marcadores de sucesso baseados nas moléculas de kDNA (Barker & Arnot, 1981; Barker & Butcher, 1983; Eresh et al., 1994; Degraeve et al. 1994; Fernandes et al., 1996; Pirmez et al., 1999; Michalsky et al., 2002). Porém, a escolha das regiões neste trabalho foi baseada na procura de um fragmento específico do mRNA que pudesse ser utilizado para experimentos visando à amplificação somente de material genético de *L. (L.) infantum chagasi*.

Alguns autores desenvolveram PCR em tempo real sensíveis que foram validados para quantificação de DNA de *Leishmania* em diferentes tecidos (Bretagne et al., 2001; Nicholas et al., 2002; Bossolasco et al., 2003; Svobodova et al., 2003; Rolão et al., 2004). O primeiro passo para a padronização da PCR tempo real foi a construção de uma curva padrão para determinar o número absoluto de parasitas, conhecer a linearidade e o limite de detecção.

O HP(LJ31) foi escolhido para a construção do marcador molecular Linj31 para os experimentos da PCR em tempo real testados em cinco grupos.

O Grupo I, constituído de 99 amostras caninas, com diagnóstico clínico, sorológico e molecular positivo para *L. (L.) infantum chagasi*; apresentou todas as amostras com resultados positivos para o marcador Linj31. Os valores do  $C_T$  variaram entre 17.2 e 36.86, tendo como média 27.52. Esses dados mostram uma boa sensibilidade do método molecular.

O Grupo II, constituído de 96 amostras com diagnóstico clínico, sorológico e molecular negativos para *L. (L.) infantum chagasi*; apresentou noventa de duas amostras negativas para o marcador Linj31. Quatro amostras apresentaram resultados negativos na PCR convencional (RV1/RV2), e resultados positivos na PCR em tempo real. Isso pode ser explicado pela maior sensibilidade apresentada pelo método de PCR em tempo real em comparação ao PCR convencional encontrada neste ensaio. Estas amostras positivas apresentaram  $C_T$  entre 34.47 e 36.31, tendo como média 35,68. Os valores encontrados são maiores que os valores encontrados no Grupo I, e bem próximos ao limite de detecção do teste ( $C_T$ , 37.74), representando uma quantidade pequena de material genético na amostra, provavelmente abaixo do limite de detecção da PCR convencional, explicando os resultados negativos obtidos.

O Grupo III, constituído de sete amostras caninas negativas para *L. (L.) infantum chagasi*, porém positivas para *L. (V.) braziliensis*. Todas as amostras apresentaram resultados negativos para o marcador Linj31, demonstrando uma boa especificidade em separar amostras pertencentes ao subgênero *Viannia*.

O Grupo IV foi constituído por duas amostras de *Trypanosoma cruzi* que apresentaram resultados negativos, reforçando os dados da especificidade. As outras duas amostras do grupo eram de *L. (L.) amazonensis* e apresentaram resultados positivos, com  $C_T$  de 36.02 e 37.07.

Embora a *L. (L.) amazonensis* seja pertencente ao subgênero *Leishmania*, ela não pertence ao grupo de espécies do “complexo donovani”. Ainda que o marcador tenha sido desenhado a partir de sequência específica de *L. (L.) infantum*, estes resultados nos levaram a concluir que o marcador poderia estar amplificando outras espécies do subgênero *Leishmania*.

Para melhor avaliar a especificidade, foram realizados novos experimentos com o marcador Linj31 no Laboratório de Biologia Molecular do Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta - USA). O Grupo V foi composto de cepas padrões de *Leishmania* da Organização Mundial da Saúde (OMS). A reação foi positiva em diversas espécies, incluindo: *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) aethiopica* e *L. (L.) pifanoi*. As cepas padrões que resultaram em um resultado negativo na PCR em tempo real foram: *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. hertigi*, *L. henrietti* e *L. gerbilli*. Diante desses resultados podemos concluir que o marcador Linj31, foi eficiente em amplificar somente amostras do subgênero *Leishmania*, no entanto não se limitou as espécies do “complexo donovani” amplificando material genético de espécies causadoras de leishmaniose cutânea.

Após se constatar que o marcador Linj31 era eficiente em determinar as formas viscerais, mas também apresentava resultados positivos em algumas espécies causadoras de formas cutâneas da leishmaniose, foi idealizado um PCR em tempo real multiplex com o objetivo de diferenciar as leishmanioses causadas por parasitas do “complexo donovani”, das causadas por parasitas do subgênero *Viannia*. Essa diferenciação se faz necessária principalmente em regiões geográficas onde ocorrem as sobreposições de áreas de transmissão das formas cutâneas e visceral da doença. A diferenciação ainda é extremamente importante devido ao fato da doença apresentar um amplo espectro de sintomas que podem ser confundido com outras infecções causadas por outros agentes etiológicos. Pode ainda contribuir nas ações epidemiológicas, documentando e

monitorando a distribuição da espécie circulante em determinada região e com isso, ajudar no planejamento de medidas de controle de reservatórios domésticos, silvestres e vetores. Outro ponto importante é a realização do diagnóstico precoce das leishmanioses, podendo prevenir o aparecimento da doença grave ou até a morte em pacientes e, em veterinária evitando o sacrifício de animais não infectados por *L. (L.) infantum chagasi*.

Com isso foi pedida a inclusão de um novo objetivo que passou a ser a padronização de uma PCR Multiplex em tempo real para a diferenciação das espécies do subgênero *Leishmania* (complexo *L. donovani*), das espécies do subgênero *Viannia*.

Com o decorrer do estudo foi desenhado e construído uma reação em tempo real, em uma única etapa, que pudesse diferenciar os subgêneros, além de identificação de gênero. Foi escolhida a região 18S para identificação do gênero *Leishmania*, e para diferenciar os complexos, novos marcadores moleculares foram desenhados a partir de sequências da actina da leishmania, uma proteína do citoesqueleto com considerável diferença entre as espécies. A actina esta presente em todos os eucariotos podendo ser monomérica ou filamentososa, e participa de importantes processos vitais como mobilidade, divisão celular, endocitose, contração e transporte intracelular. A actina esta presente na forma de grânulos e filamentos na região cortical e na bolsa flagelar das espécies de *Leishmania*. Os filamentos são organizados em matrizes específicas na superfície da membrana onde regulam a forma da célula. Também esta presente no núcleo, associada a cromatina e mantendo se conservada nos organismos. Tanto a forma promastigota como amastigota, contém os microtúbulos como o maior componente do citoesqueleto. A rede de actina é associada aos microtúbulos durante o processo de migração celular, clivagem e transporte (Sahasrabudde et al., 2004 Peacock et al, 2007; Kapoor et al, 2008 ).

Dos 66 isolados positivos para espécies do subgênero *Viannia*, 59 (89,4%) foram positivas no marcador de gênero CY-5, e 60 (90,9%) amostras foram positivas no marcador FAM, específico para subgênero

*Viannia*. Nenhuma amostra negativa ou pertencendo a outro subgênero foi positiva no marcador FAM. Este teste apresentou alta especificidade, diferenciando muito bem os subgêneros analisados. As sete amostras com resultados negativo no marcador CY-5, e as 6 negativas no marcador FAM, podem ser explicadas pela baixa concentração de material genético na amostra, pela dosagem pelo Nanodrop, ocasionando a competição inibitória entre os marcadores pelo DNA, ou pela variação genética dos isolados, que somente seriam evidenciados por métodos de clonagem e sequenciamento.

Dos 110 isolados de *Leishmania* do complexo *donovani*, 100 (90,9%) foram positivos no marcador de gênero e 94,5% (104 amostras) foram positivas no marcador HEX. Nenhuma amostra negativa ou pertencente ao subgênero *Viannia* foi positiva no marcador HEX. As dez amostras com resultados negativo no marcador CY-5, e as 6 negativas no marcador HEX, podem ser explicadas também pela competição inibitória entre os marcadores pelo DNA da amostra, ou pela variação genética dos isolados.

As amostras das espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) major* apresentaram resultados positivos apenas no marcador de gênero. Esses dados são interessantes pelo fato desta reação conseguir diferenciar espécies com baixa circulação e distribuição no Estado de São Paulo.

As outras espécies analisadas pertencentes ao subgênero *Leishmania*, como *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica*, apresentaram resultados positivos também para o marcador HEX. Isso pode ser explicado pela grande proximidade filogenética entre as espécies, pois pertencem ao subgênero *Leishmania*. Porém isso não seria um inconveniente ao teste, visto que as espécies *L. (L.) tropica* ocorrem na região do Mediterrâneo, sul da Europa, norte da África e oeste da Ásia. A espécie *L. (L.) aethiopica*, se restringe a regiões do Quênia e Etiópia. Ambas são causadoras de formas cutâneas e são transmitidas por diversas espécies de *Phlebotomus*.

As 93 amostras negativas não apresentaram nenhum  $C_T$  em nenhuma análise realizada, confirmando a especificidade frente a diversos agentes etiológicos.

Estudos posteriores são necessários para comprovar a capacidade e competência vetorial dos ectoparasitas para se tentar comprovar a transmissão vetorial.

## 6. Conclusões.

1- A extração de DNA de *Leishmania* em carrapatos e pulgas foi eficiente e a PCR a partir do RNA evidenciou a viabilidade dos parasitas em todos os estádios evolutivos dos ectoparasitas, inclusive após a ecdise.

2- Carrapatos e pulgas podem estar cooperando para a disseminação da LVA em cães, principalmente devido a alta frequência de infestação e a alta prevalência de *L. (L.) infantum chagasi* viáveis nos ectoparasitas. Porém, com esses dados, não foi possível concluir se os ectoparasitas atuam como vetores necessitando de novos estudos.

3. PCR em tempo real (LINJ31) foi eficiente na detecção de espécies do subgênero *Leishmania* e a PCR em tempo real multiplex, na diferenciação de espécies dos subgênero *Viannia* e complexo *donovani*.

4. O marcador molecular (CY5) da PCR em tempo real multiplex foi capaz de detectar todas as espécies de *Leishmania spp* analisadas.

## 6. Referências Bibliográficas

- Aagaard-Hansen J, Nombela N, Alvar J. Population movement: a key factor in the epidemiology of neglected tropical diseases. *Trop Med Int Health*. 2010;15:1281–1288.
- Aragão HB. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1936; 31(4):759-844.
- Armstrong TC & Patterson JL. Cultivation of *Leishmania braziliensis* in an economical serum-free medium containing human urine. *J Parasitol*. 1994;80:1030–1032.
- Ashford RW, Desjeux P, Deraadt P. Estimation of populations at risk of infection with leishmaniasis. *Parasitol. Today*. 1992; 8: 104-105.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer F. Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*. 2008; 24:324–330.
- Barker DC, Arnot DE. Biochemical identification of cutaneous leishmaniasis by analysis of kinetoplast DNA. I. Ultrastructural and buoyant density analysis. *Mol Biochem Parasitol*. 1981 May;3(1):33-46.
- Barker DC, Butcher J. The use of DNA probes in the identification of leishmaniasis: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1983;77(3):285-97.
- Barker DC. 2008. Kinetoplast minicircle sequence database [On line]. Disponível em <http://www.ebi.ac.uk/parasites/kDNA/Source.htm>.

- Bern C, Joshi AB, Jha SN, Lal Das M, Hightower GD, Thakur GD, Bista MB. Factors associated with visceral leishmaniasis in Nepal: bed- net use is strongly protective. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;63: 184-188.
- Blanc G, Caminopetros J. La transmission du Kala–Azar méditerranéen par une tique: *Rhipicephalus sanguineus*. *C. R.Acad. Sci.* 1930; 191, 1162–1164.
- Borges BKA. Fatores de risco para leishmaniose visceral em Belo Horizonte, 2006 [Tese de Mestrado]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.
- Bossolasco S, Gaiera G, Olchini D, Gulletta M, Martello L, Bestetti A, et al. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2003 ;41(11):5080-4.
- Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, et al. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001 ;8(4):828-31.
- Camargo-Neves VLF & Katz G. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1999, 32 (Supl.II): 63-64.
- Camargo-Neves VLF, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lages LC, Spinola RMF, Cruz OG. Use of spatial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 1998 – 1999. *Cad. Saúde Pública, R. Janeiro.* 2001; 17: 1263-1267.

Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Poletto DW, Gomes AC. Feeding habit of *Lutzomyia longipalpis* in Araçatuba county, State São Paulo, Brasil. *Entom. Vector.* 2002; 9 (Supl. 1): 63.

Camargo-Neves VLF. A leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. BEPA Boletim Epidemiológico Paulista, 6. 2004. Disponível em URL <http://www.sucen.sp.gov.br> ou <http://www.cve.saude.sp.gov.br>

Camargo-Neves VLF e Grupo de Estudos em leishmanioses. Classificação epidemiológica dos municípios para a leishmaniose visceral americana. Bol. Epidem. Paul. 2007; 39: 27-39. [Boletim on line]. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br>

Chagas E. Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Science.* 1936 Oct 30; 84(2183): 397-398.

Colombo FA, Odorizzi RM, Laurenti MD, Galati EA, Canavez F, Pereira-Chiocola VL. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol Res.* 2011;109(2):267-74.

Costa AIP, Casanova C, Rodas LAC, Galati EAB. 1997. Atualização da distribuição geográfica e o primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil; notas e informações. *Rev. Saúde Pub.*,31:632-633.

Coura, JR. Leishmaniose tegumentar americana. p. 697-712. In: Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 2005a. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

Coura, JR. Calazar. p. 713-732. In: Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 2005b. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

- Coura, JR. Identificação de Leishmania. p. 733-738. In: Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 2005c. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Coutinho, MT. Investigação da capacidade vetorial de sifonápteros e ixodídeos na leishmaniose visceral canina. Belo Horizonte 2003 [Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais].
- Coutinho MT, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, de Maria M, et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. Vet Par. 2005;128:149-155.
- Coutinho MT & Linardi PM. 2007. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? Vet. Parasitol., 147:320-325.
- CUNHA AM & CHAGAS E, 1937. Nova espécie de protozoário do Gênero *Leishmania* patogênico para o homem (nota prévia). *O Hospital* vol. XI (2): 5-9.
- CVE –SP - Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, 2011. [http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/zoo/lvah\\_auto9904.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/zoo/lvah_auto9904.htm).
- Dantas-Torres F. Current epidemiological status of visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. Rev Saude Pub. 2006; 40:537–541.
- Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Vet Parasitol. 2007; 10:139–146.

- Dantas-Torres F, Lorusso V, Testini G, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Stanneck D, Mencke N, Brandão-Filho SP, Alves LC, Otranto D. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitol Res.* 2010a; 106:857–860.
- Dantas-Torres F, Martins TF, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Lima BS, Brandão-Filho SP. Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. *Exp Parasitol.* 2010b; 125:184–185.
- Deane LM. & Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop.* 1962;4: 198-212.
- Degrave W, Fernandes O, Campebell D, Bozza M, Lopes U. Use of Molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – A mini review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1994; 89: 463-469.
- Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinical in dermatology.* 1996; 14:417-423.
- Díaz-Espiñeira MM, Slappendel RJ. A case of autochthonous canine leishmaniasis in the Netherlands. *Vet Q.* 1997; 19:69–71.
- Donovan C. Memoranda: On the Possibility of the Occurrence of Trypanosomiasis in India. *Br Med J.* 1903 Jul 11; 79.
- Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, et al. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12:440–446.

- Eresh S, McCallum SM, Barker DC. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology*. 1994 Nov;109 ( Pt 4):423-33.
- Evans TG, Teixeira MJ, Mcauliffe IT et al. 1992. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian. *J. Inf. Dis.*, 166: 1124-1132.
- Fernandes O, Bozza M, Pascale JM, de Miranda AB, Lopes UG, Degrave WM. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania (Viannia)*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996;91(3):279-84.
- Ferreira AW & Avila SLM. Sorologia: Importância e Parâmetros. In: *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 2001a. p. 1-8.
- Ferreira AW & Avila SLM. Leishmanioses. In: *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2ª edição; 2001b p. 255-262.
- Ferreira MG, Fattori KR, Souza F, Lima VM. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania spp.* *Vet Parasitol*. 2009;165(1-2):150-4.
- Fortes E. 1997. *Parasitologia veterinária*, 3ª ed. rev. e ampl. Ed. Ícone. 686p.
- Galati EB, Nunes VL, Rego-Junior FA, Oshiro ET, Chang MR. *Phlebotomines* (Díptera: *Psychodidae*) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Saúde Pública*. 1997; 31:378-390.

Gaskin AA, Schantz P, Jackson J, Birkenheuer A, Tomlinson L, Gramiccia M, et al. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. *J Vet Intern Med.* 2002; 16:34–44.

Giraud P, Ranque J, Cabassu H. Epidemiologie de la leishmaniose viscérale humaine mediterrannée, en particulier dans ses rapports avec la leishmaniose canine. *Arch. Fr. Ped.* 1954;11,337–353.

Gomes AH, 1999. - Dados epidemiológicos da DIR XXIII – Sorocaba

Gomes AH, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, Garcia AS, Araujo MF, Pereira-Chiocola VL, 2007. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2007 Mar 31;144(3-4):234-41.

Goodman JL, Dennis DT, Sonenshine DE. Overview of tick-borne infections in humans. *In: Tick-borne Diseases of Humans.* Washington D.C.: ASM Press; 2005; p.3-12.

Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for the future research. *Rev Clin Microbiol.* 1993; 6:230-250.

Guarga, J., Moreno, L., Lucientes, J.J., Gracia, M.J., Penibanez, M.A.J., Alvar, J., Castillo, J.A., Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Acta Trop.* 2000; 77, 203–207.

IBGE-Cidades@ - Município de Mirandópolis.  
<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>

- Kapoor P, Sahasrabuddhe AA, Kumar A, Mitra K, Siddiqi MI, Gupta CM. An unconventional form of actin in protozoan hemoflagellate, *Leishmania*. *J Biol Chem*. 2008 Aug 15;283(33):22760-73.
- Kullberg M, Nilsson MA, Arnason U, Harley EH and Janke A. 2006. Housekeeping genes for phylogenetic analysis of eutherian relationships. *Mol. Biol. Evol.* 23 (8), 1493-1503.
- Kupfer, B., Vehreschild, J., Cornely, O., Kaiser, R., Plum, G., Viazov, S., et al. Leishmaniasis in Ancient Egypt and Upper Nubia. *Emerging Infectious Diseases*. 2006; 12, 116–117.
- Lainson R & Rangel EF, *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. 2005; *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 100(8): 811-827.
- Lainson R & Shaw JJ. Evolution classification and geographical distribution. *In: Peters W, Killick-Kendrick K. The Leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press. 1987; 1(1) 120.
- Lainson R & Shaw JJ. New World Leishmaniasis: The Neotropical *Leishmania* species. 1998. *In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D (eds), Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology*, Vol. 5, Arnold, London, p. 241-266.
- Leishman WB. On the Possibility of the Occurrence of Trypanosomiasis in India. *Br Med J*. 1903 May 30; 1(2213): 1252–1254.
- Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aueuvre JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, Rousseau D, Kubar J (1999) Occurrence of *Leishmania infantum*

parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. J Clin Microbiol 37:1953–1957

Linardi PM, Nagem RL. Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães de Belo Horizonte e municípios vizinhos. Rev Brasil Biol. 1973; 33:529-538.

Linardi PM & Guimarães LR. Sifonápteros do Brasil. Ed. Museu de Zoologia USP/FAPESP. 2000; 291p.

Lindoso JAL & Goto H. 2007. Leishmaniose visceral: situação atual e perspectivas futuras. Bol. Epidem. Paul., 26, 7-11. [Boletim on line]. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br>.

Little SE, Hostetler J, Kocan KM. Movement of *Rhipicephalus sanguineus* adults between co-housed dogs during active feeding. Veterinary Parasitology. 2007; 150 (2007) 139–145.

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 Nov;42(11):5249-55.

Marzochi MAC & Marzochi KBF. Tegumentary and visceral Leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. *Cad. Saúde Pública*.1994; 10: 359-375.

Marzochi MCA, Schubach AO, Marzochi KBF. Leishmaniose tegumentar americana. In Cimerman B & Cimerman. S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. São Paulo, Atheneu. 1999; 39-64.

Marzochi MAC, Schubach AO, Marzochi KBF. 2002. Leishmaniose tegumentar americana e Leishmaniose visceral americana (Calazar

- americana ou Neotropical). p.39-80. *In: Cimerman B & Cimerman S – Parasitologia humana e seus fundamentos gerais*. Atheneu. 2ª edição.
- da Matta VLR; Souza CSF; Marcondes M, Carvalho AK; Tomokane TY, Aschar M; Corbett CEP, Laurenti MD. 2011. A new serological quick test for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis with applicability in field settings. 7th European Congress on Tropical Medicine and International Health, Barcelona, Spain. Abstract Book, PG 26-27.
- Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genetic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*. 1999; 119: 237-246.
- Mehlhorn H. Leishmania. *In: Encyclopedia of Parasitology*. Dusseldorf: Springer 3ª edição; 2008 p.696-699.
- Mehlhorn H. Contribution of Vector Ticks. *In: Encyclopedia of Parasitology*. Dusseldorf: Springer 3ª edição; 2008 p.1409-1410.
- Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PF, Secundino NF, Dias ES. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania spp* in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2002;44(5):255-9.
- Michalsky EM, Fortes-Dias CL, França-Silva JC, Rocha MF, Barata RA, Dias ES. Association of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104:1191–1193.
- Migone LE. Um caso de kalazar a Assuncion (Paraguai). *Bull Soc Pathol Exot*. 1913; 6: 118-20.

Ministério da Saúde do Brasil (MSB). “Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral”. 2007.

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_leish\\_visceral2006.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf)

Ministério da Saúde do Brasil (MSB)- Portal da saúde. 2011a online em:

[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31937](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31937).

Ministério da Saúde do Brasil (MSB). 2011b online em:

[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31927](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31927).

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

Momen H, Grimaldi Jr G, Deane LM. *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL)? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987; 82: 447-448.

Monteiro PS.; Lacerda; MM; Arias; Jr. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*.27 1994; Supl 3: 67-72.

Monteiro PS. Leishmaniose visceral no Brasil: perspectivas de controle. *Ver Soc Bras Med Trop*. 2002;35 (supl. 1):335.

Moshfe A, Mohebalí M, Edrissian G, Zarei Z, Akhoundi B, Kazemi B, et al. Canine visceral leishmaniasis: asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. *Acta Trop*. 2009; 112 (2):101-105.

- Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues. *J Clin Microbiol.* 2002;40(5):1666-9.
- Odorizzi RMFN, Kaneto CN, Mesquita RT, Pereira-Chiocola VL, Galati EAB. 2007a. Estudo da leishmaniose visceral canina e de vetores das leishmanioses no Município de Mirandópolis, região noroeste do Estado de São Paulo. Trabalho apresentado no XX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2007, Recife. *Rev. Patol. Tropical*, 36: 730
- Odorizzi RMFN, Kaneto CN, Mesquita RT, Pereira-Chiocola VL, Galati EAB. 2007b. Pesquisa de *Leishmania (L.) chagasi* em Ixodídeos retirados de cães com leishmaniose visceral provenientes do CCZ de Araçatuba, região nordeste do Estado de São Paulo. Trabalho apresentado no XX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2007, Recife. *Rev. Patol. Tropical*, 36: 593.
- Oliveira CDL, Morais MHF, Machado-Coelho GLL. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: Challenges for control. *Cad. Saúde Pública.* 2008; 24 (12): 2953-2958.
- Passos VMA, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CMF, Romanha AJ. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Tropica.* 1999; 72:251-258.
- Paz GF, Ribeiro MF, Michalsky EM, da Rocha Lima AC, França- Silva JC, Barata RA, Fortes-Dias CL, Dias ES. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2010; 6:523–528

- Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet.* 2007 Jul;39(7):839-47.
- Pirmez C, da Silva Trajano V, Paes-Oliveira Neto M, da-Cruz AM, Gonçalves-da-Costa SC, Catanho M, et al Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1819-23.
- Queiroz PVS, Monteiro GRG, Macedo VPS, Rocha MAC, Batista LMM, Queiroz JW, et al. Canine visceral leishmaniasis in urban áreas of Northeast Brazil. *Veterinary Science.* 2009; 86: 267–273.
- Ravel S, Cuny G, Reynes J, Veas F. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Trop.* 1995; 59:187-196.
- Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(1):21-5.
- Rey L. *Leishmania* e leishmanioses: os parasitos. *In:* Rey L. – Rey :*Parasitologia* . Rio de janeiro: Guanabara Koogan 3ª edição; 2001a, p. 214-226.
- Rey L. O complexo “*Leishmania braziliensis*” e as Leishmaniases tegumentares americanas. *In:* Rey L. – Rey :*Parasitologia*. Rio de janeiro: Guanabara Koogan 3ª edição; 2001b, p. 227- 239.
- Rey L. O complexo “*Leishmania donovani*” e a leishmaniose visceral.. *In:* Rey L. – Rey :*Parasitologia*. Rio de janeiro: Guanabara Koogan 3ª edição; 2001c, p. 253-266.

- Rolão N, Cortes S, Rodrigues OR, Campino L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Parasitol.* 2004;90(5):1150-4.
- Ross R. Further Notes on Leishman's Bodies. *Br Med J.* 1903 Nov 28; 2 (2239): 1401.
- Sahasrabudde AA, Bajpai VK, Gupta CM. A novel form of actin in *Leishmania*: molecular characterisation, subcellular localisation and association with subpellicular microtubules. *Mol Biochem Parasitol.* 2004 Mar;134(1):105-14.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- 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
- Schallig HDFH & Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Intern Health* 2002; 7: 641–651.
- Schmidt GP, Roberts LS. Parasitic Insects: Diptera, Flies. *In: Foundations of Parasitology.* 2009a;601-625. Mc Graw Hill. 8ª edição.
- Schmidt GP, Roberts LS. Parasitic Insects: Fleas, Order Siphonaptera. *In: Foundations of Parasitology.* 2009b; 589-600. Mc Graw Hill. 8ª edição.

SES, Comitê de Leishmaniose Visceral Americana da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. *BEPA Boletim Epidemiológico Paulista*, vol 8, nº96. 2011. Disponível em URL <http://www.cve.saude.sp.gov.br>

Shaw JJ. Taxonomy of genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994, 89: 471-478.

Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(5): 577-579.

Sherlock IA. Nota sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev. Brasil. Malariol. D. Trop*. 1964;16: 19-26.

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.

Svobodová M, Votýpka J, Nicolas L, Volf P. *Leishmania tropica* in the black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sand fly vector *Phlebotomus sergenti*. *Microbes Infect*. 2003 ;5(5):361-4.

Tolezano JE. 1994. Ecoepidemiological Aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in the State of São Paulo. Brazil. *Memória de Oswaldo Cruz*;89(3): 427-434.

Tolezano JE, Rodrigues EN, Barbosa JER, Cunha E., Tanaguchi, HH, Barbosa JAR, Araujo MFL, Bisugo MC, Garcia AS, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM, Cruz L. Expansão da leishmaniose visceral por terras paulistas. Focos de transmissão de LV canina em

municípios da região metropolitana de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2003; 36 (Supl. I): 360.

Troughton DR, Levin ML. Life cycles of seven ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions. *J Med Entomol.* 2007;44(5):732-40.

WHO–World Health Organization. 2011a online em:

[http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html)

WHO–World Health Organization. 2011b online em:

[http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Documents/DD\\_viscerai.pdf](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Documents/DD_viscerai.pdf)

Wirth DF, Pratt DM. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;(22):6999-7003.

Zijlstra EE, El-Hassan Am. Leishmaniasis in Sudan: 3. Visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95 (suppl. 1) : 27-58.

## **7-Anexos**

Comissão de Ética em  
Experimentação Animal

**CEEA**

**FAMERP**

*Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto*

**Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA**

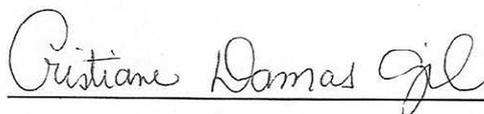
FAMERP Autarquia Estadual, Av. Brig. Faria Lima 5416 CEP 15090.000 Tel. 3201-5700 S.J.Rio Preto/ SP

### COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

O projeto de pesquisa intitulado "Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo: estudo de transmissores alternativos e da diversidade gênica entre os isolados" (Protocolo FAMERP nº 3498/2008) sob responsabilidade da Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos, por cumprir com os princípios éticos exigidos em experimentação animal, foi aprovado pela CEEA-FAMERP.

Lembramos ao senhor pesquisador a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

São José do Rio Preto, 14 de Julho de 2008.



Profa. Dra. Cristiane Damas Gil

Presidente CEEA - FAMERP

## Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs

Fabio A. Colombo · Rosa M. F. N. Odorizzi ·  
Marcia D. Laurenti · Eunice A. B. Galati ·  
Flavio Canavez · Vera L. Pereira-Chioccola

Received: 15 June 2010 / Accepted: 24 December 2010  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** The occurrence of the insect vector (sand flies) with low rates of *Leishmania* infection, as well as autochthonous transmission in the absence of the natural vector in dogs, have been reported. These unexpected data suggest a hypothesis of other arthropods as a possible way of *Leishmania* transmission. The prevalence of *Leishmania (Leishmania) infantum* in fleas and ticks collected from dogs with canine visceral leishmaniasis (CVL), as well as parasite viability, were evaluated herein. The presence of *L. (L.) infantum* was assayed by PCR and ELISA in ectoparasites and biological samples from 73 dogs living in a Brazilian endemic area. As the occurrence of *Leishmania* DNA in ticks and fleas is expected given their blood-feeding habits, we next investigated whether parasites can remain viable inside ticks. PCR and ELISA confirmed that 83% of the

dogs had CVL. Fleas and ticks (nymphs, male and female adults) were collected in 55% and 63% of the 73 dogs, respectively. Out of the 60 dogs with CVL, 80% harbored ectoparasites infected with *L. (L.) infantum*. The infection rates of the ectoparasites were 23% and 50% for fleas and ticks, respectively. The RNA analysis of the extract from ticks left in laboratory conditions during 7 to 10 days after removal from CVL dogs showed that parasites were alive. In addition, live parasites were also detected inside adult ticks recently molted in laboratory conditions. These findings indicate a higher infection rate of *L. (L.) infantum* in ticks and fleas, but they do not conclusively demonstrate whether these ticks can act as vectors of CVL, despite the fact that their rates were higher than those previously described in *Lutzomyia longipalpis*. The presence of viable *L. (L.) infantum* in ticks suggests the possible importance of dog ectoparasites in CVL dissemination.

F. A. Colombo · V. L. Pereira-Chioccola (✉)  
Laboratório de Parasitologia, Instituto Adolfo Lutz,  
Av. Dr Arnaldo, 351 8 andar,  
CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brazil  
e-mail: pchioccola@ial.sp.gov.br

R. M. F. N. Odorizzi · E. A. B. Galati  
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo,  
São Paulo, Brazil

R. M. F. N. Odorizzi  
Coordenadoria de Defesa Agropecuária,  
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São  
Paulo,  
São Paulo, Brazil

M. D. Laurenti  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo,  
São Paulo, Brazil

F. Canavez  
Genoa Biotecnologia SA,  
São Paulo, Brazil

### Introduction

*Leishmania* causes a wide spectrum of human diseases, ranging from self-limited cutaneous forms to the more severe diffuse cutaneous and visceral forms, as a consequence of the complex host immunological response and the species of parasite involved. Particularly, visceral leishmaniasis is an important anthroponosis in which men and dogs may act as hosts. The disease has spread worldwide and is found in the Americas, Africa, Southern Europe, and Asia. In the Americas, it is prevalent from Mexico to Argentina (Grimaldi and Tesh 1993; Lainson and Shaw 1998).

The worldwide prevalence of visceral leishmaniasis is estimated at 400,000 to 600,000 new cases per year (Stuart et al. 2008; WHO 2010). In Brazil, between 2,500 and

5,000 cases are reported each year, with 600 in Sao Paulo state (MSB 2010). Another considerable problem is the urbanization of the infection, with a growing incidence in periurban and urban cases. Approximately 10% of the populations who live in endemic areas are at risk for acquiring the infection (CVE 2010).

Viscerotropic leishmaniasis in Latin America is caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* (Degraeve et al. 1994; Lainson and Shaw 1998). Amastigote forms live and multiply by binary division within cells of the mononuclear phagocytic system of their mammalian hosts (Grimaldi and Tesh 1993). The extracellular promastigote forms of the protozoan occur in the gut of phlebotomine sand flies. The main vector is *Lutzomyia longipalpis*; however, other phlebotomine species may also be potential vectors (Gaskin et al. 2002; Lainson and Rangel 2005). Natural transmission occurs principally by the bite of infected sand flies, although other means of transmission may be involved, since in some places of South America, these insects usually show low rates of natural infection. Alternative transmission has been discussed, particularly in some areas where cases of canine visceral leishmaniasis (CVL) have been reported, but the presence of proven vectors has not yet been demonstrated (Gaskin et al. 2002; Dantas-Torres et al. 2005; Schantz et al. 2005; Duprey et al. 2006). In Sao Paulo state, a high incidence of CVL has been observed despite low or no occurrence of its natural vector *L. longipalpis* in some counties (Costa et al. 2001; Camargo-Neves 2004). Alternative means of transmission might include dog bites; transplacental, sexual, and blood transfusion; and arthropods such as fleas and ticks (Coutinho et al. 2005; Rosypal et al. 2005; Duprey et al. 2006; Freitas et al. 2006; Coutinho and Linardi 2007; Silva et al. 2009a, b).

The hypothesis of the transmission of *L. (L.) infantum* by fleas (*Ctenocephalides felis felis*) and ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) has long been discussed (Blanc and Caminopetros 1930; Giraud et al. 1954; Sherlock 1964) and has already been demonstrated experimentally (Coutinho et al. 2005; Coutinho and Linardi 2007; Dantas-Torres et al. 2010a, b; Paz et al. 2010). Ticks and fleas are widely distributed and abundant among high-density canine populations. In addition, they have high reproductive rates. Ticks fed on blood may undergo long periods of fasting. If fed, *R. sanguineus* can live between 160 and 170 days until reaching adulthood. Unfed adults can survive for 12 months or more under standardized laboratory conditions (Troughton and Levin 2007). The dietary habit associated with high longevity may contribute to the species being a potential vector of leishmaniasis in endemic areas.

These data led us to investigate two subjects. The first was the prevalence of *L. (L.) infantum* in fleas and ticks (nymphs, female and male adults), by PCR, collected from a group of dogs naturally infected in an endemic area of

CLV in Sao Paulo, Brazil. The second was whether ticks were infected with live parasites, using gene expression.

## Materials and methods

Canine samples, ectoparasites, and parasite strain

From August 2008 to May 2009, we collected ectoparasites and biological samples from 73 dogs living in Mirandópolis, a small city located in northwest Sao Paulo state, Brazil. The dogs were brought to the “Zoonosis Control Center,” as part of the standard CVL control policy in Brazil. The majority of the animals were stray dogs or were sent by the owners due to the onset of clinical signs of disease. The animals were selected considering epidemiological risk factors, such as proximity to other infected dogs as well as serological diagnosis, signs, or symptoms of the disease. All dogs showed clinical signs of the disease such as onychogryphosis, alopecia, lymphadenopathy, ulcerative lesions, intense itching, opaque peltry, seborrheic dermatitis, hyporexia, and cachexia. After immobilization and clinical examination, each dog was sedated for the removal of all ticks and/or fleas on the entire body, using forceps and/or by picking off with the fingers. After being removed from the dogs, the ectoparasites were stored in plastic tubes and individually identified. Ticks were identified and separated into groups of nymphs and female and male adults according to the classification previously described (Aragão 1936). Fleas were identified according to the classification described in Linari and Guimarães (2000).

The specimen number (ticks or fleas) varied among dogs (10 to 50 per animal). The tubes containing the ectoparasites were transported to the Instituto Adolfo Lutz (around 600 km) within 7 to 10 days and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. For parasite viability experiments, 25 nymphs collected from ten dogs were used; these were maintained in plastic petri dishes at  $22^{\circ}\text{C}$  until reaching adulthood. Collected canine sera and lymph node necropsy fragments were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

DNA obtained from *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/72/LD/strain 46; WHO reference strain) was used as a positive control in molecular techniques and as antigen in ELISA. Promastigotes were grown at  $25^{\circ}\text{C}$  in Eagle's medium, supplemented with 292 mg/L L-glutamine, 110 mg/L sodium pyruvate, 2.2 g/L sodium bicarbonate, 0.02% hemin, 10% heat-inactivated fetal calf serum, and 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamicin (Armstrong and Patterson 1994; Gomes et al. 2007). In the log curve phase, parasites were harvested and washed three times in phosphate-buffered saline (pH 7.2) at 1,000 g for 10 min. This study was performed according to the recommendations of the “Colegio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA) and approved by ethics committees of the institutions involved.

## Serological diagnosis in dogs

The assays were made by ELISA using a crude soluble antigen of *L. (L.) infantum* promastigotes. The parasite pellets, dissolved in phosphate-buffered saline, were lysed by freeze–thawing, followed by sonication, and centrifuged at 10,000×g for 20 min at 4°C. The supernatant was used as antigen in a concentration of 10 µg/ml using high-binding microplates. Canine serum samples were diluted 1:400 in PBS-T, and bound antibodies were detected using canine anti-IgG alkaline-phosphatase conjugant followed by chromogen solution (10 mg/ml of pNPP). The optical density reactions were read at 405 nm. Positive and negative control sera were run in each plate to standardize the readings and plate variations. The cutoff point between negative and positive results was calculated as the mean of the negative controls plus three standard deviations.

## Molecular experiments

### DNA and RNA extractions

Canine DNA samples were obtained from lymph node necropsy fragments. Ectoparasite DNA samples were taken in groups per dog. The number of the ectoparasites used in DNA or RNA extraction depended on the infestation of each animal. Normally, groups of female and male ticks, nymphs, or fleas for each dog were composed of two to five specimens per extraction. The whole bodies of the ectoparasites were refrozen with liquid nitrogen and homogenized into a mash with the aid of a disposable plastic pestle. For DNA extraction, lymph node fragments and ectoparasites were dissolved in 10 mM tris–HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.01% *N*-laurilsarcozyl, and 100 µg/ml proteinase K, vortex mixed, and incubated at 56°C until complete cell lysis (around 18 h). DNA was extracted using PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The positive samples in PCR were selected for RNA extraction using two to five specimens per dog. RNA molecules were extracted and purified using the Spin Tissue RNA Mini Kit (Invisorb) according to the manufacturer's instructions. DNA and RNA purities were determined at 260 and 280 nm, respectively, in a NanoDrop ND100 (Thermo Scientific).

### Primer selection

The experiments for PCR were made using the following primer sets: The presence of *L. (L.) infantum* in canine and ectoparasite samples was determined by RV1-RV2 marker (5'CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG3' and 5'CCACCTGGCCTATTTTACACCA3'), which amplified a 145-bp product from LT1 fragment of kDNA minicircles of

the *Leishmania. donovani* complex (Ravel et al. 1995; Le Fichoux et al. 1999; Gomes et al. 2007). The determination of live parasites in the ectoparasites was made by reverse transcription PCR (RT PCR) using RV1-RV2 and PRP (5'CGCGCAAGCAGAAGATCCACAACC3' and 5'TCCAT-GAACTGCGGCTTGTCC 3') markers. PRP amplified a 272-bp sequence from *L. (L.) infantum* JPCM5 paraflagellar rod protein (partial mRNA-GeneBank accession number XM\_0014645931). To control the course of extraction and check for PCR inhibitors, all canine samples were assayed using the marker GAPDH 4 (5'AGGCTGAGAACGG-GAAACTT3' and 5'ATTAAGTTGGGGCAGGGACT3') (Kullberg et al. 2006) that amplified a 911-bp fragment of a canine glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. The reactions using the canine primer pair were run simultaneously with the same temperature protocol for the RV1-RV2 marker and in the same PCR machine. All positive PCRs for canine GAPDH confirm the good quality of dog DNA extractions. DNA sequencing was made using the HPLJ31 marker (5'ATGCAGCTGCTGATTGTGC3' and 5'CAGGTGCAGCTCATCAGG3'), which amplified 140 bp from *L. (L.) infantum* hypothetical protein, partial mRNA (GeneBank accession number XM\_001467352). The LINJ31 primer set for a real-time PCR was designed in Primer Express software by Applied Biosystems and was also based on the same *L. (L.) infantum* hypothetical protein (partial mRNA; GeneBank accession number LinJ31.1310). The LINJ31 designer is 5'CCGCGTGCCTGTGC3' and 5'CCCACACAAGCGGGAAGT3', and the TaqMan probe, FAM dye-labeled, is 5'CCTCCTTGGACTTTGC3'. The primer set had NFQ as reporter quencher.

### Conventional PCR and reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

After RNA extraction, the samples were immediately processed for cDNA syntheses. Each RT-PCR reaction was performed according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The RNA samples (11 µl) were mixed with 1 mM dNTP, 3 µg random primers, and 10 mM DTT in 250 mM tris–HCl (pH 8.3) in a final volume of 20 µl. cDNA samples were stored at –20°C until use. Each PCR was performed by adding 5 µl of DNA template (or cDNA) and 25 pmol of each primer, using a kit purchased from Promega (Go Taq Green Master Mix), in a final volume of 25 µl. The PCR mix (12.5 µl) was composed of 1 unit of Taq DNA polymerase, 10 mM tris–HCl (pH 8.5), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 200 mM of each dNTP. Each amplification run contained two negative controls (ultra-pure water and a canine DNA sample negative for *Leishmania*) and one positive control (DNA extract of *L. (L.) infantum* promastigotes). After the thermal cycles, PCR products were electrophoresed in 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. DNA

fragments were visualized under UV illumination. The images were analyzed by a Mini Bis Gel Imager and Documentation (BioSystematica). The fragment sizes were estimated based on comparisons with a 100-bp ladder.

#### Real-time PCR

The reactions were performed with Applied Biosystems (ABI 7300 Real Time PCR System) in a final volume of 20  $\mu$ l. The samples or control DNA was added to a reaction mixture containing 10  $\mu$ l of 2 $\times$  TaqMan Universal PCR Master Mix (NoAmpliErase UNG) and 1  $\mu$ l of the “Assay Mix” that included: (i) the forward primer, 18  $\mu$ M; (ii) the reverse primer, 18  $\mu$ M; (iii) the TaqMan probe, FAM dye-labeled, 5  $\mu$ M and reporter quencher NFQ. Amplification runs contained two negative controls and one positive control, as used in PCR. The thermal profile was performed at 50°C for 2 min for optimal AmpliErase UNG activity and at 95°C for 10 min. Next, 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min were performed. Reactions were previously standardized using as template serial promastigote DNA dilutions. The cycle threshold value  $C_T$  was indicative of the quantity of the target gene.

#### DNA sequencing

The RT PCR and real-time PCR product (from ticks) were used for DNA sequencing after purification using a “Wizard SV gel and PCR Clean-up System kit” (PROMEGA) according to the manufacturer's instructions. The fragments were sequenced using forward and reverse primers to amplify the sequence of HP(LJ31). Sequencing was done using the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit. Reaction and electrophoreses were made in an ABI Prism 377 DNA Sequencer. Nucleotide sequences were analyzed, manually assembled, and aligned for comparison using BioEdit Sequence Alignment Editor. The sequence alignments were compared to the sequences in the GeneBank database using basic local alignment search tool (BLAST) from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

**Table 1** Frequency of dog infestation with fleas and ticks

Ectoparasites	Number of dog ectoparasites analyzed			
	With leishmaniasis <sup>a</sup> (60)	Without leishmaniasis <sup>a</sup> (13)	Total (73)	Percent infestation
Fleas	32	08	40	55%
Ticks				
Nymphs	18	06	24	33%
Adult males	34	07	41	56%
Adult females	39	07	46	63%

<sup>a</sup> CVL was determined by ELISA and PCR

## Results

### Occurrence of CVL and frequency of infestation with ticks and fleas in dogs

An overview of the occurrence of CVL in the canine population studied as well as the frequency of infestation with ticks and fleas is shown in Table 1. The presence of anti-*Leishmania* antibodies (by ELISA) and *L. (L.) infantum* DNA molecules in the lymph node fragments (by PCR using the marker RV1/RV2) indicated 60 of the 73 dogs were positive for CVL. The majority of the animals were infested with a large number of fleas and ticks (around 10 to 50 specimens per animal). From the 73 dogs, 40 (55%) hosted fleas (32 had CVL). Tick nymphs were shown in 24 dogs (33%), of which 18 had CVL. Male ticks were present in 41 dogs (56%), of which 34 had CVL. Females were extremely abundant in this group of dogs. A substantial portion of dogs (46–63%) were infected with female ticks with a large quantity of dog blood. CVL was observed in 39 of them.

### Prevalence of *L. (L.) infantum* in ticks and fleas collected from dogs with CVL

The percent of ticks and fleas infected with *L. (L.) infantum* collected from dogs with CVL is shown in Table 2. Out of the 60 dogs with CVL, 12 harbored ectoparasites negative for *L. (L.) infantum* in PCR. The other 48 dogs (80%) harbored ectoparasites infected with *L. (L.) infantum*. From them, 17 (28.3%) had positive fleas. Positive nymph and female and male ticks were present in 14 (23.3%), 20 (33.3%) and 30 (50%) dogs, respectively. No fleas and ticks collected from the 13 dogs without CVL were infected with *L. (L.) infantum*.

### Investigation of the viability of *L. (L.) infantum* into ticks collected from dogs with CVL

The second part of our study was to investigate the viability of *L. (L.) infantum*, using gene expression, in ticks collected from naturally infected dogs. As the presence of RNA of *L.*

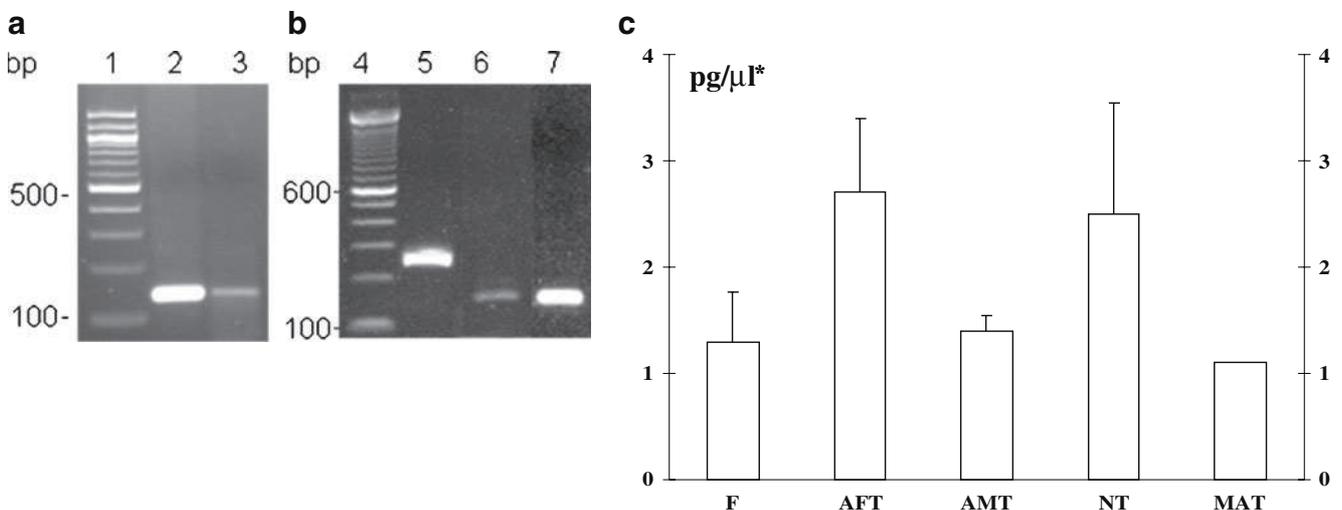
**Table 2** Prevalence of *L. (L.) infantum* in ticks and fleas collected from dogs with CVL

Ectoparasites <sup>a</sup>	Number of dogs with CVL having positive ectoparasites for <i>L. (L.) infantum</i> (n=60)		
	PCR <sup>b</sup>		Percent positivity
	Neg	Pos	
Fleas	15	17	28.3%
Ticks			
Nymphs	04	14	23.3%
Adult males	14	20	33.3%
Adult females	09	30	50.0%

<sup>a</sup> Groups of ticks or fleas per dog were thawed and homogenized in a mash for DNA extraction and PCR

<sup>b</sup> Number of dogs infested with positive (pos) and negative (neg) ectoparasites for *L. (L.) infantum*

*L. (L.) infantum* indicates live parasites in the ticks, paired samples (DNA and RNA from the same group of ticks) were tested. The experiments were made by RT PCR, testing the internal contents from ticks in pool per dog, since they have greater blood volume than the fleas. *L. (L.) infantum* was determined using the molecular marker RV1-RV2. As shown in Fig. 1a, both products were amplified, suggesting that the parasites remain alive inside the ticks.



**Fig. 1** *L. (L.) infantum* viability inside the ticks determined by RT PCR and real-time PCR. Amplified products indicated in panels **a** and **b** were analyzed in electrophoresis 2% agarose gel. Panel **a** shows two 145-bp products amplified by the RV1/RV2 marker which is specific to a region of kDNA minicircles from the *L. donovani* complex. Lane 2, DNA and lane 3, RNA extracted from two different pools of female ticks collected from the same dog. Panel **b** shows the RT PCR using a sample of cDNA from RNA extracted from a group of recently molting adult ticks. Line 5, 272-bp product amplified from *Leishmania* paraflagellar rod protein using the marker PRP; line 6, 145-bp product amplified by the RV1/RV2; and line 7, positive control using

Next, in order to investigate whether parasites were able to remain alive after tick ecdysis, a group of 25 ticks in the nymph stage was kept alive in laboratory conditions until molting. Then, RNA molecules were extracted from 10 recently molting adult ticks and subsequent synthesis of cDNA. As shown in Fig. 1b, two amplified PCR products from two markers (RV1-RV2 and PRP), which amplify different regions of *L. (L.) infantum* regions, were amplified. These results suggested that parasites remain alive inside the ticks after molting. These data were further confirmed by real-time PCR after determination of *L. (L.) infantum* cDNA concentrations. As shown in Fig. 1c, real-time PCR detected  $1.3 \pm 0.47$ ,  $2.7 \pm 0.7$ ,  $1.4 \pm 0.15$ , and  $2.5 \pm 1.04$  pg/μl in 5 RNA samples/group of fleas, adult female, adult male, and nymph ticks, respectively. A single RNA sample from the group of the recently molting adult ticks presented the concentration of 1.1 pg/μl. These data suggest the ability of ticks to preserve viable genetic material after ecdysis from the nymph stage to adult.

The high sensitivity and specificity of RV1-RV2 molecular marker were previously investigated in samples collected from dogs living in the Mediterranean region (Lachaud et al. 2002) and Brazil (Gomes et al. 2007). Specificity was further confirmed by testing DNA extracted from other trypanosomatids, such as *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, and *Trypanosoma cruzi*, and other canine disease-causing bacteria such as *Rickettsia*

DNA of an infected dog (using the RV1/RV2 marker). Lanes 4 and 7, standard molecular size of 100-bp ladder. Panel **c** shows the concentrations (in picograms per microliter) of *L. (L.) infantum* cDNA extracted from a group of fleas (F), adult female ticks (AFT), adult male ticks (AMT), nymph ticks (NT), and recently molting adult ticks (MAT). The results are expressed in means and standard deviations of 5 experiments per group, except MAT that was tested only in one sample. \*Concentrations of *L. (L.) infantum* cDNA were previously standardized, correlating the  $C_T$  value and known concentrations of *L. (L.) infantum* promastigotes (MHOM/BR/72/LD/strain 46-WHO reference strain) maintained in culture

*rickettsii* and *Ehrlichia canis* (Gomes et al. 2007; Pereira-Chioccola 2009). These experiments were also complemented by analysis of the 140-bp sequence amplified by HPLJ31 marker by DNA sequencing. The alignments evaluated in NCBI/nucleotide–nucleotide BLAST revealed 89% homology with the following sequences in Genebank: *L. donovani donovani* strain AG83, differentially regulated gene 1 (DRG1), and gene 2 (DRG2) (accession numbers GQ214330.1 and GQ214331.1, respectively). *L. infantum* JPCM5 hypothetical proteins (LinJ31.1310 and LinJ31.1270) (accession numbers XM\_001467352 and XM\_001467348, respectively).

## Discussion

Visceral leishmaniasis has been increasing worldwide, principally due to a substantial rise in human and domestic animal traffic contributing to spreading leishmanial infection in low- or non-endemic areas (Stuart et al. 2008; Aagaard-Hansen et al. 2010; WHO 2010). Canine infection is considered a major potentially fatal zoonotic infection in regions of Europe, Africa, Asia, and South America. Particularly in South America, millions of dogs are infected. In some endemic regions, the prevalence of CVL is around 63–80% (Dantas-Torres 2006; Dantas-Torres 2007; Baneth et al. 2008; MSB 2010). This situation has led in recent years to diagnosing CVL in previously non-endemic areas such as different regions of São Paulo state in Brazil. In addition, the occurrence of *L. longipalpis* with low rates of *Leishmania* infection have been reported in different Brazilian endemic areas (Missawa and Dias 2007; Michalsky et al. 2009; Savani et al. 2009). Similar situations have been reported in other countries. Autochthonous transmission in the absence of the natural vector in dogs has occurred in the USA, Canada, and Netherlands (Díaz-Espíñeira and Slappendel 1997; Gaskin et al. 2002; Duprey et al. 2006). All these data together suggest that other transmission means may be involved in the *Leishmania* spp. cycle. As one hypothesis proposes transmission by other arthropods, the prevalence of *L. (L.) infantum* in ticks, as well as their viability, was evaluated herein.

Previous studies experimentally demonstrated the capacity of ectoparasites to be infected by *Leishmania*, as well as their ability to promote the infection by means of the inoculation of ticks or fleas triturates in rodents (Coutinho et al. 2005; Coutinho and Linardi 2007; Ferreira et al. 2009).

In our study from the 73 dogs, the laboratory diagnosis confirmed that 83% were infected, since this region is endemic for CVL with many cases per year. Interestingly, the occurrence of *L. longipalpis* is usually low in certain seasons of the year (Odorizzi and Galati 2007; CVE 2010), and the majority of the studied animals were infested with a

large number of fleas and ticks. Fleas were collected in 55% of the 73 studied dogs. Nymph, male and female ticks were collected in the majority of them.

The high infection rate in the ectoparasites found in our study is related to the ectoparasite's habitat, as this parasite is mostly found living on the skin of dogs. Around 80% of the studied dogs with CVL harbored ectoparasites (fleas and/or ticks) infected with *L. (L.) infantum*. Differently, sand flies occasionally have contact with the dog's skin and, therefore, may represent fewer chances for infection. In addition, previous studies demonstrated that the infection rate of sand flies in endemic areas has been estimated as less than 1% (Missawa and Dias 2007; Michalsky et al. 2009; Savani et al. 2009). However, *Leishmania* could be adapting to other vectors independent of the occurrence or non-occurrence of the natural vector (Costa et al. 2001; Camargo-Neves 2004; Dantas-Torres et al. 2005; Odorizzi and Galati 2007). In addition to our data being consistent with other studies (Coutinho et al. 2005; Coutinho and Linardi 2007; Ferreira et al. 2009; Paz et al. 2010), they also could indicate a higher infection rate by *L. (L.) infantum* ticks and fleas, compared with that found in *L. longipalpis*. These findings do not conclusively demonstrate whether these ectoparasites can act as vectors of CVL, but they show a high incidence of infection by *L. (L.) infantum*.

As the occurrence of *L. (L.) infantum* DNA from ticks and fleas is expected, given their blood-feeding habits, the second part of this study was directed at investigating whether parasites remain viable inside ticks. The results showed that parasites were alive for a long period (7 to 10 days after removal from the dogs). In addition, live parasites could be detected inside ticks after ecdysis, which occurred in laboratory conditions.

These findings, combined with a recent study that detected *Leishmania* kDNA in the salivary glands of *R. sanguineus* (Dantas-Torres et al. 2010a, b), suggest that during blood feeding, ticks could release live parasites, since they excrete a large amount of liquid during the feeding. The presence of viable *L. (L.) infantum* in ticks suggests the possible importance of dog ectoparasites in CVL dissemination.

**Acknowledgments** This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil (FAPESP) (proc 08/00520-6). FAC was supported by fellowships from FAPESP (proc-08/57245-7).

## References

- Aagaard-Hansen J, Nombela N, Alvar J (2010) Population movement: a key factor in the epidemiology of neglected tropical diseases. *Trop Med Int Health* 15:1281–1288
- Aragão HB (1936) Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 31:759–844

- Armstrong TC, Patterson JL (1994) Cultivation of *Leishmania braziliensis* in an economical serum-free medium containing human urine. *J Parasitol* 80:1030–1032
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer F (2008) Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 24:324–330
- Blanc G, Caminopetros J (1930) La transmission du Kala—Azar méditerranéen par une tique: *Rhipicephalus sanguineus*. *Compt Rendus Acad Sci* 191:1162–1164
- Camargo-Neves VLF (2004) A leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. Estado atual. *Bol Epid Paul* 6. At: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>
- Costa CHN, Gomes ACG, Costa JML, Vieira JBF, Lima JWO, Dietz R (2001) Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 34:223–228
- Coutinho MT, Linardi PM (2007) Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet Parasitol* 147:320–325
- Coutinho MT, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, Maria M, Genaro O, Linardi PM (2005) Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 128:149–155
- CVE—Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (Surveillance Epidemiological Center of Sao Paulo State) (2010). Site in Portuguese. At: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>
- Dantas-Torres F (2006) Current epidemiological status of visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Rev Saude Pub* 40:537–541
- Dantas-Torres F (2007) The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 10:139–146
- Dantas-Torres F, Faustino MAG, Lima OC, Acioli RV (2005) Epidemiologic surveillance of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Recife, Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 38:444–445
- Dantas-Torres F, Lorusso V, Testini G, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Stanneck D, Mencke N, Brandão-Filho SP, Alves LC, Otranto D (2010a) Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitol Res* 106:857–860
- Dantas-Torres F, Martins TF, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Lima BS, Brandão-Filho SP (2010b) Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. *Exp Parasitol* 125:184–185
- Degrave W, Fernandes O, Campebell D, Bozza M, Lopes U (1994) Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*—a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89:463–469
- Díaz-Espinoeira MM, Slappendel RJ (1997) A case of autochthonous canine leishmaniasis in the Netherlands. *Vet Q* 19:69–71
- Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, Schantz PM (2006) Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000–2003. *Emerg Infect Dis* 12:440–446
- Ferreira MG, Fattori KR, Souza F, Lima VM (2009) Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Vet Parasitol* 165:150–154
- Freitas E, Melo MN, Costa-Val AP, Michalick MS (2006) Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol* 137:159–167
- Gaskin AA, Schantz P, Jackson J, Birkenheuer A, Tomlinson L, Gramiccia M, Levy M, Steurer F, Kollmar E, Hegarty BC, Ahn A, Breitschwerdt EB (2002) Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. *J Vet Intern Med* 16:34–44
- Giraud P, Ranque J, Cabassu H (1954) Epidemiologie de la leishmaniose viscérale humaine méditerranéenne, en particulier dans ses rapports avec la leishmaniose canine. *Arch Fr Ped* 11:337–353
- Gomes AH, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, Garcia AS, Araujo MF, Pereira-Chioccolla VL (2007) PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 144:234–241
- Grimaldi G, Tesh RB (1993) Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for the future research. *Clin Microbiol Rev* 6:230–250
- Kullberg M, Nilsson MA, Arnason U, Harley EH, Janke A (2006) Housekeeping genes for phylogenetic analysis of eutherian relationships. *Mol Biol Evol* 23:1493–1503
- Lachaud L, Marchegui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P (2002) Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 40:210–215
- Lainson R, Rangel EF (2005) *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil—a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:811–827
- Lainson R, Shaw JJ (1998) New world leishmaniasis—the neotropical *Leishmania* species. In: Collier L, Balows A, Sussman M (eds) *Topley & Wilson's microbiology and microbial infections*, vol 5, 9th edn. Wiley, London
- Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuve JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, Rousseau D, Kubar J (1999) Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol* 37:1953–1957
- Linari PM, Guimarães LR (2000) Sifonápteros do Brasil. Ed. Museu de Zoologia USP/FAPESP. 291pp
- Michalsky EM, Fortes-Dias CL, França-Silva JC, Rocha MF, Barata RA, Dias ES (2009) Association of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:1191–1193
- Missawa NA, Dias ES (2007) 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* 102:913–918
- MSB—Ministerio da Saude do Brasil (Health Ministry of Brazil) (2010) Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral (visceral leishmaniasis: surveillance and control. Technical manual) (in Portuguese). At <http://portal.saude.gov.br/portal/svs>
- Odorizzi RM, Galati EA (2007) Sand flies in the Aguapeí river floodplain, northwest area of State of São Paulo, Brazil. *Rev Saude Publ* 41:645–652
- Paz GF, Ribeiro MF, Michalsky EM, da Rocha Lima AC, França-Silva JC, Barata RA, Fortes-Dias CL, Dias ES (2010) Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 6:523–528
- Pereira-Chioccolla VL (2009) Molecular diagnosis of leishmaniasis: contribution to the American visceral leishmaniasis surveillance program in Sao Paulo state. *Bol Epidemiol Paul* 6:4–13. doi: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>
- Ravel S, Cuny G, Reynes J, Veas F (1995) A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Trop* 59:187–196
- Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS (2005) Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J Parasitol* 91:970–972
- Savani ES, Nunes VL, Galati EA, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM (2009) 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* 160:18–24
- Schantz PM, Steurer FJ, Duprey ZH, Kurpel KP, Barr SC, Jackson JE, Breitschwerdt EB, Levy MG, Fox JC (2005) Autochthonous

- visceral leishmaniasis in dogs in North America. *J Am Vet Med Assoc* 226:1316–1322
- Sherlock IA (1964) Nota sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 16:19–26
- Silva FL, Oliveira RG, Silva TM, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL (2009a) Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 160:55–59
- Silva SM, Ribeiro VM, Ribeiro RR, Tafuri WL, Melo MN, Michalick MSM (2009b) First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Vet Parasitol* 3:159–162
- Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R (2008) Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 118:1301–1310
- Troughton DR, Levin ML (2007) Life cycles of seven ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions. *J Med Entomol* 44:732–740
- WHO—World Health Organization (2010) At: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Documents/DD\\_visceral.pdf](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Documents/DD_visceral.pdf)