



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
DIANA ROMÃO BEZERRA VASCONCELOS

**DETECÇÃO DE *Leishmania chagasi* EM *Lutzomyia longipalpis* POR
MEIO DE qPCR EM TEMPO REAL:
Triagem de genes e métodos quantitativos**

FORTALEZA-CEARÁ
2010

DIANA ROMÃO BEZERRA VASCONCELOS

DETECÇÃO DE *Leishmania chagasi* EM *Lutzomyia longipalpis* POR MEIO DE qPCR EM
TEMPO REAL:

Triagem de genes e métodos quantitativos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Profa. Dra.: Claudia Maria Leal Bevilaqua

FORTALEZA-CEARÁ
2010

V331d Vasconcelos, Diana Romão Bezerra
Detecção de *Leishmania chagasi* em *Lutzomyia longipalpis* por meio de qPCR em tempo real: Triagem de genes e métodos quantitativos/ Diana Romão Bezerra Vasconcelos. — Fortaleza, 2010.
68 p.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Claudia Maria Leal Bevilaqua
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.
1. *Leishmania chagasi*. 2. *Lutzomyia longipalpis*. 3. PCR. 4. Genes. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 614.4

DIANA ROMÃO BEZERRA VASCONCELOS

DETECÇÃO DE *Leishmania chagasi* EM *Lutzomyia longipalpis* ATRAVÉS DA PCR EM
TEMPO REAL:
TRIAGEM DE GENES E MÉTODOS QUANTITATIVOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Claudia Maria Leal Bevilaqua
Universidade Estadual do Ceará – UECE
(Orientadora)

Prof^a Dr^a Luciana Magalhães Melo
Universidade Estadual do Ceará – UECE
(Co-Orientadora)

Prof^a Dr^a Rossana de Aguiar Cordeiro
Universidade Federal do Ceará - UFC
(Examinadora)

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre guiando meu caminho e oferecendo-me oportunidades únicas como esta.

Aos meus pais e irmã, pelo apoio e incentivo desde sempre.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

À minha orientadora, Dra Cláudia Maria Leal Bevilaqua, pela sua sabedoria, confiança e ensinamentos a mim concebidos. Bem como seu apoio essencial à realização deste trabalho.

À Dra Luciana Magalhães Melo pela dedicação, competência e exigência com a organização e execução dos experimentos.

À Dra Rossana de Aguiar Cordeiro, pela disposição e participação da banca de avaliação proporcionando discussões e sugestões que servirão para aprendizado e incentivo à pesquisa.

Aos ICs, mestrandos e doutorandas do LABODOPAR pela cooperação mútua.

À doutoranda Fernanda Cristina Rondon pelo auxílio pessoal e profissional presente nas horas mais difíceis.

À mestranda Marianna Colares Albuquerque pela amizade e troca de experiências desde a graduação até a conclusão do curso do mestrado.

À toda equipe do LFCR que me recebeu com muita hospitalidade, destacando o auxílio de importância indescritível das ICs Érica Souza Albuquerque e Maria Cláudia dos Santos Luciano.

Ao meu esposo, Francisco Nelinho Augusto Vasconcelos Filho, pelo amor, paciência, companheirismo, prestatividade e por me fazer muito feliz ao seu lado.

Às minhas amigas de todas as horas

A todos que acreditaram em mim e de uma forma ou de outra me ajudaram na conclusão deste trabalho.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral é uma doença endêmica no Brasil cujo agente etiológico é o protozoário *Leishmania chagasi* e o principal vetor é o flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Estudos epidemiológicos têm utilizado a PCR convencional para mensurar a taxa de infecção de flebotomíneos coletados a campo. Entretanto, a PCR em tempo real consegue detectar cargas parasitárias muito baixas, reduzindo a quantidade de falso negativo e quantificando o número de leishmânias no flebotomíneo. Este trabalho objetivou comparar genes com diferentes números de cópias para detectar e quantificar *L. chagasi* em diferentes *pools* de *L. longipalpis* através da PCR em tempo real. Foram misturados *pools* de *L. longipalpis* contendo 1, 10 e 30 exemplares machos com *L. chagasi* oriunda de diluição seriada, formando grupos com 50, 500, 5.000 e 50.000 parasitos. Para amplificação do DNA de *L. chagasi*, foram usados *primers* direcionados para o gene que codifica a polimerase α , a subunidade ribossomal 18S e o kDNA. A especificidade foi determinada pela análise da curva de *melting* após cada PCR e visualização do produto amplificado em gel de agarose a 1,5%. Os parasitos foram mensurados por quantificação absoluta e relativa. Determinou-se a linearidade (R^2) e a eficiência (E) das reações de PCR a partir de curvas padrão geradas para cada gene usando diluições seriadas de DNA de leishmânia e flebotomíneo. As curvas padrão foram estabelecidas com amostras variando de 0,23 fg a 2,3 ng de DNA de leishmânia e 1,46 pg a 14,6 ng de DNA de flebotomíneo. A análise da PCR demonstrou a capacidade de amplificar até 0,004 parasitos. A quantificação dos parasitos usando *primers* que amplificam o gene da polimerase α apresentou inexatidão, principalmente em grupos com reduzido número de leishmânias. Em relação ao gene que codifica o 18S, a estimativa foi mais exata, porém imprecisa. Os melhores resultados foram observados com os *primers* que amplificam o kDNA, especialmente na quantificação relativa, onde não houve interferência do tamanho do *pool* de flebotomíneos. A amplificação do kDNA apresentou a maior sensibilidade dentre os genes testados, bem como mensurações exatas e precisas.

Palavras Chave: *Leishmania chagasi*, *Lutzomyia longipalpis*, PCR, genes

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is an endemic disease in Brazil. Its etiological agent is *Leishmania chagasi*, and its main vector species is the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Epidemiological studies have used conventional PCR to measure the rate of infection of sand flies collected in the field. However, real-time PCR can detect lower parasitic loads, reducing the number of false negatives and improving the quantification of *Leishmania* in the sand fly. This paper aimed to compare genes with various numbers of copies to detect and quantify *L. chagasi* in various pools of *L. longipalpis* by real-time PCR. We mixed pools of 1, 10 and 30 male sand flies with *L. chagasi* from serial dilution, forming groups with 50, 500, 5000 and 50000 *Leishmania* parasites. For the amplification of *L. chagasi* DNA, primers targeting kDNA and the genes encoding the polymerase α and the 18S subunit of the ribosome were employed. Specificity was determined by melting-curve analysis after each PCR and by visualization of amplicons on 1.5% agarose gels. Parasites were measured by absolute and relative quantification. To determine the linearity (R^2) and the efficiency (E) of the PCR amplifications, standard curves were generated for each gene using serial dilutions of *Leishmania* and sand fly DNA. The standard curves were established with samples ranging from 0.23 fg to 2.3 ng of *Leishmania* DNA and 1.46 pg to 14.6 ng sand fly DNA. The PCR analysis demonstrated the capacity to amplify the DNA equivalent of 0.004 parasites. Parasite quantification using primers targeting the polymerase α gene exhibited inaccuracy, especially in groups with reduced numbers of *Leishmania* protozoans, and the measurements suffered interference from the number of sand flies present in the sample. Conversely, in the case of primers targeting the gene encoding the 18S ribosomal subunit, the estimates were more accurate, but imprecise. The best results were observed with primers targeting kDNA, especially in the relative quantification, which indicated no interference from the pool of sand flies and demonstrated the greatest sensitivity among the genes tested as well as accurate and precise estimates.

Keywords: *Leishmania chagasi*, *Lutzomyia longipalpis*, PCR, genes

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Flebotomíneos da espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i> . Fêmea (a) e macho (b).....	17
Figura 2: Ciclo de <i>Leishmania</i> spp em vetor competente	19
Figura 3: Estrutura da V-ATP na forma de holoenzima (esquerda) e dissociada (direita).....	21
Figura 4: Amastigotas (esquerda) e promastigotas (direita) de <i>Leishmania</i> spp.....	22
Figura 5: Representação esquemática de minicírculo.....	23
Figura 6: Variação da temperatura (°C) durante um ciclo de PCR.....	25
CAPITULO I	
Figure 1. Specificity of real-time PCR amplifications for <i>L. chagasi</i> quantification in the presence or absence of sand fly during DNA extraction	39
Figure 2. Linearity, efficacy and sensitivity of real-time PCR amplifications used for quantification of <i>L. chagasi</i> in sand flies.....	40
Figure 3. Precision of Ct values obtained from real-time PCR amplifications using polymerase α , 18S ribosomal subunit and kDNA <i>Leishmania</i> sequences.....	41
Figure 4. Influence of the number of sand flies present before DNA extractions on the accuracy of real-time PCR quantifications used to estimate the number of <i>Leishmania</i> protozoans in sand flies	42
Figure 5: Accuracy and precision of real-time PCR quantification methods used to estimate the number of <i>Leishmania</i> protozoans in sand flies.....	43

LISTA DE TABELAS

	Pág
CAPÍTULO I	
Table 1. Oligonucleotides used to amplify <i>Leshmania infantum</i> and <i>Lutzomyia longipalpis</i> genes in real-time PCR assays.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
μM	Micromolar
18S	Subunidade menor do RNA ribossomal 18S
CV	Coefficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Eficiência
kDNA	DNA do cinetoplasto
LV	Leishmaniose Visceral
min	Minutos
mL	Mililitros
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pol α	DNA Polimerase α
qPCR	PCR em tempo real quantitativo
R ²	Coefficiente de correlação de Pearson
s	Segundos
S	Coefficiente angular
V-ATP	ATPase vacuolar

SUMÁRIO

	Pág
1.Introdução	12
2. Revisão de Literatura	14
2.1 Leishmaniose Visceral	14
2.1.1 Distribuição Geográfica	14
2.1.2 Epidemiologia	14
2.1.3 Situação atual e estratégias de controle	16
2.2 Vetor	16
2.2.1 Ciclo do parasito no vetor.....	18
2.2.2 Estudos moleculares em <i>L. longipalpis</i>	20
2.3 Os parasitos	21
2.3.1 Características moleculares de <i>Leishmania</i> spp	22
2.3.2 kDNA.....	23
2.3.3 RNA ribossomal 18S.....	23
2.3.4 Polimerase alfa.....	24
2.4 Diagnóstico da infecção do flebotomíneo	24
2.5 Reação em Cadeia da Polimerase.....	24
2.5.1 PCR em tempo real.....	25
3. Justificativa	27
4. Hipótese Científica	28
5. Objetivos	29
5.1 Gerais	29
5.2 Específicos	29
Capítulo I	30
Conclusão.....	46
Perspectiva.....	47
Referências Bibliográficas.....	48
Apêndices	59

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania* e apresentam diversas manifestações clínicas. A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais severa caracterizando-se por ser uma doença crônica e potencialmente letal (WHO, 2004). É causada por *Leishmania donovani* na Índia e no leste da África e *L. infantum* na Europa e norte da África (LUKES et al., 2007). No Novo Mundo, *L. chagasi* é única espécie descrita como agente etiológico da LV. Contudo, pesquisas recentes baseadas em métodos enzimáticos e genéticos demonstraram que as diferenças entre cepas de *L. infantum* e *L. chagasi* são tão pequenas que alguns autores acreditam tratar-se de uma mesma espécie (MAURICIO et al., 1999; MAURICIO et al., 2000; KUHLS et al., 2005).

No Brasil, a leishmaniose visceral é uma doença endêmica com registro de surtos frequentes sendo *Lutzomyia longipalpis* a espécie de flebotomíneo descrita como principal vetor da leishmaniose visceral (LAINSON & RANGEL, 2005). Devido à falta de vacinas comprovadamente eficazes e ao pequeno número de drogas utilizadas para tratamento, o estudo e controle do vetor continua sendo um importante componente no controle da leishmaniose (DESJEUX, 2004). Taxas de infecção natural eram tradicionalmente estimadas por identificação microscópica de leishmânia no intestino de flebotomíneos dissecados. Entretanto, o método é laborioso e a distinção entre as formas flageladas para identificação da espécie do parasito é difícil. Métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) estão sendo usados em estudos epidemiológicos para determinação da taxa de infecção em flebotomíneos. Os achados dos estudos com PCR convencional mostram baixas taxas de infecção variando de 0,4% a 3,9% (MARTÍNS-SÁNCHEZ et al., 2006; OLIVERIA-PEREIRA et al., 2006; PAIVA et al., 2006; SILVA et al., 2008). Em comparação com PCR em tempo real, o PCR convencional demanda mais tempo e apresenta dados apenas qualitativos. Nos ensaios com PCR em tempo real, os produtos da reação são analisados no momento da realização da ciclagem e os resultados

são tanto qualitativos como quantitativos. Esta técnica vem sendo utilizada por diversos autores, em amostras provenientes de cães e de humanos, possibilitando a realização de estudos relacionados à carga parasitária, interação hospedeiro-parasito e monitoramento da terapia (NICOLAS et al., 2002; MARY et al., 2004; MORTARINO et al., 2004; ROLÃO et al., 2004; FRANCINO et al., 2006).

Em flebotomíneos, têm-se descrito que a maior diferença entre infecção natural e experimental é que a dose infectante de parasitas provavelmente consiste de 1 a 1000 promastigotas metacíclicas em condições naturais, mas vários milhões de leishmânias em infecções experimentais (ROGERS et al, 2004). Conseqüentemente, a PCR em tempo real seria mais útil nesse tipo de estudo por detectar pequenas cargas parasitárias (RANASINGHE et al, 2008).

Para detecção de *Leishmania* spp através do DNA, os autores amplificam regiões dos minicírculos do kDNA e genes que codificam a subunidade menor do RNA ribossomal, DNA polimerase alfa, glicose 6-fosfato desidrogenase e hexokinase (FERNANDES et al., 1993; BRETAGNE et al., 2001; PRINA et al., 2007). Entretanto, há escassez de estudos comparando a sensibilidade dos genes bem como o nível de exatidão das quantificações feitas pelos mesmos através da PCR em tempo real.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose Visceral

Também conhecida como Calazar, a leishmaniose visceral (LV) é a forma mais severa dentre as leishmanioses, potencialmente letal e caracteriza-se por ser uma doença crônica que apresenta como sintomatologia: febre ondulante, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e/ou linfadenopatias e anemia (WHO, 2004). Entretanto, o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais sensíveis e específicas demonstrou a existência de alta prevalência da infecção e baixa prevalência da doença clínica.

2.1.1 Distribuição geográfica

A leishmaniose visceral (LV) é um importante problema de saúde pública no Velho e Novo Mundo. Ocorre em 65 países, distribuídos em cinco continentes, sendo a África o mais afetado. São esperados 500.000 novos casos e mais de 50.000 mortes anuais. Cerca de 90% dos casos são registrados em áreas pobres rurais e suburbanas de seis países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil (CHAPPUIS et al., 2007).

No Brasil, a leishmaniose visceral é uma doença endêmica com registro de surtos frequentes. Historicamente, a maior parte dos casos ocorre no nordeste. Nos últimos anos as regiões sudeste e norte assumem uma proporção significativa desses casos. À década de 90 mais de 85% das notificações ocorriam no nordeste. Na medida em que a doença se expandiu para outras regiões e atingiu áreas urbanas e periurbanas, essa situação foi se modificando e, entre os anos 2000 e 2002, a região nordeste apresentava uma redução para 77% dos casos no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Em 2005, os estados nordestinos passaram a representar 56% do total de casos (ALVES, 2009).

2.1.2 Epidemiologia

Existem dois tipos de transmissão da LV. A primeira envolve o ciclo zoonótico, onde a doença é transmitida ao homem a partir de um vetor que fez o repasto sanguíneo em reservatório animal. A segunda envolve o ciclo antroponótico, onde a LV é transmitida de homem para homem através do vetor. No primeiro, os seres humanos são hospedeiros ocasionais e os animais, principalmente cães, são os reservatórios do parasito (ALVAR et al., 2004). A

transmissão de *L. chagasi* se dá pelo ciclo zoonótico. O ciclo antroponótico é encontrado em áreas de transmissão de *L. donovani* (CHAPPUIS et al., 2007).

Os reservatórios silvestres da doença são raposas (*Cerdocyon thous*), marsupiais (*Didelphis albiventris*) e roedores (*Nectomys squamipes*), enquanto que o principal reservatório doméstico é o cão (DANTAS-TORRES et al., 2006). Recentemente, o gato doméstico (*Felis catus*) foi encontrado naturalmente infectado por *L. chagasi*, em uma área de transmissão de LV no estado de São Paulo (SAVANI et al., 2004). No entanto, o papel epidemiológico do gato é ainda incerto. Em 2002, o papel da galinha doméstica (*Gallus gallus*) na epidemiologia da LV urbana no Brasil foi discutido. Sabe-se que a infecção por *Leishmania* spp é incapaz de desenvolver-se em algumas aves e também que a infecção existente nos flebotomíneos pode ser reduzida com a ingestão de sangue de aves devido à sua ação deletéria sobre as formas promastigotas (ALEXANDER et al., 2002). Por outro lado, os frangos são muito atraentes para os flebotomíneos e também para hospedeiros reservatórios de *L. chagasi*, como as raposas. Consequentemente, os frangos podem favorecer a ligação entre o ciclo de transmissão silvestre e o doméstico. Assim, em algumas regiões, a presença de galinhas domésticas deve ser tido como um fator de risco para o aparecimento de vetores e hospedeiros reservatórios de *L. chagasi* próximo a habitações humanas (DANTAS-TORRES et al., 2006).

No Brasil, a LV inicialmente tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte, sendo também conhecida por: Calazar, barriga d'água, entre outras denominações menos conhecidas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A doença é mais freqüente em crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de 5 anos. A razão da maior susceptibilidade das crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular agravado pela desnutrição, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio. Por outro lado, o envolvimento do adulto tem repercussão significativa na epidemiologia da LV, pelas formas frustras (oligossintomáticas) ou assintomáticas, além das formas com expressão clínica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

As transformações no ambiente, provocadas pelo intenso processo migratório, por pressões econômicas ou sociais, a pauperização conseqüente de distorções na distribuição de renda, o processo de urbanização crescente, o esvaziamento rural e as secas periódicas acarretam a expansão das áreas endêmicas e o aparecimento de novos focos. Este fenômeno leva a uma redução do espaço ecológico da doença, facilitando a ocorrência de epidemias. O ambiente característico e propício à ocorrência da LV é aquele de baixo nível socioeconômico, pobreza,

promiscuidade, prevalente em grande medida no meio rural e na periferia das grandes cidades. Entretanto, estas características vem se modificando, principalmente, nos estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste, onde a LV se encontra urbanizada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

2.1.3 Situação atual e estratégias de controle

As medidas de controle adotadas no Brasil baseiam-se no inquérito sorológico canino e na eutanásia de cães sororreagentes, bem como na aplicação de inseticidas, diagnóstico e tratamento adequado dos casos humanos registrados, como preconiza a Organização Mundial de Saúde (GONTIJO & MELO, 2004). Entretanto, tais medidas não tem sido capazes de prevenir a expansão geográfica e a ascensão da incidência e letalidade (DANTAS-TORRES et al., 2006). As vacinas estão em fase experimental ou de avaliação (MIRÓ et al., 2008). As perspectivas de controle são dependentes do progresso em pesquisas para se obter melhores alternativas e estratégias de gerenciamento dos casos e controle dos vetores (DESJEUX et al., 2004).

2.2 Vetor

A primeira descrição de *L. longipalpis* foi feita por Lutz e Neiva em 1912 a partir de insetos capturados nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Trata-se de um díptero da família Psychodidae. A distribuição coincidente de *L. longipalpis* e LV na maior parte da América Latina reforçou a idéia inicial de que este seria o principal vetor da doença na região (LAINSON & RANGEL, 2005). A relação de provas que incriminavam *L. longipalpis* como principal transmissor de LV foi concluída quando cinco transmissões distintas para hamsters foram obtidas experimentalmente pela picada de destes flebotomíneos (LAINSON et al., 1977). Vale ressaltar que no estado do Mato Grosso do Sul, a LV também pode ser transmitida por *L. cruzi* e, em Pernambuco, *L. migonei* está sendo considerado possível vetor (SANTOS et al, 1998; PITA-PEREIRA et al., 2008; CARVALHO et al., 2010).

No Brasil, *L. longipalpis* ocorre nas regiões norte, nordeste, centro oeste, sudeste e recentemente na região sul (LAINSON & RANGEL, 2003). Estes flebotomíneos colonizaram o meio rural e, no final dos anos 1980, a espécie começou a invadir o ambiente urbano, especialmente a periferia das grandes cidades, onde foi capturado no intradomicílio e peridomicílio - no último caso, em dependências com animais domésticos (LAINSON & RANGEL, 2005).



Figura 1: Flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Fêmea (a) e macho (b).

Fonte: <http://www.parasitesandvectors.com>

Os flebotomíneos, assim como muitos outros dípteros hematófagos, necessitam de suprimentos de carboidratos que, na natureza, adquirem diretamente da seiva de plantas, néctar (ALEXANDER & USMA, 1994), secreções de afídeos e frutas maduras (CAMERON et al., 1995). A hematofagia é um hábito exclusivo das fêmeas, que necessitam do sangue para a oviposição e o obtém sugando diversos vertebrados (mamíferos, aves, répteis e anfíbios). Durante o dia, os flebotomíneos adultos se mantêm abrigados em locais escuros e úmidos. Os ovos são depositados em microambientes ricos em matéria orgânica que fornece alimento para as larvas (ALEXANDER et al., 2002).

Rangel et al (1986), estudaram o ciclo biológico de uma colônia de *L. longipalpis* e demonstraram que o ciclo completo de ovo a adulto variou de 28 a 36 dias, dependendo da fonte de sangue. A produtividade dos flebotomíneos melhorou quando alimentados com sangue de hamster e pinto em comparação com o homem e o cão. A oviposição inicia-se normalmente no 5º dia após a refeição de sangue e varia de 24 a 52 ovos por fêmea. As fêmeas são atraídas pelo hexanol e 2-metil-2-butanol presente em fezes de frango ou coelho. Esses compostos estimulam a oviposição (DOUGHERTY et al., 1995). A eclosão dos ovos ocorre geralmente após 6 a 9 dias, com o desenvolvimento de larvas e pupas em cerca de 14 a 19 dias e 8 a 9 dias, respectivamente (RANGEL et al., 1986).

L. longipalpis encontra-se naturalmente infectado por *L. chagasi* após o repasto sanguíneo em hospedeiro contaminado e em infecções experimentais conseguiu-se a infecção deste flebotomíneo por *L. chagasi*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (DA SILVA, 1990). Foi

demonstrada transmissão de *L. amazonensis* por *L. longipalpis* após o repasto sanguíneo em hamster infectado (SHERLOCK et al., 1996).

Nos últimos anos, *L. longipalpis* está sendo considerado um complexo de espécies ocorrendo, portanto, variações no ciclo biológico, na morfologia e na fisiologia entre as colônias. Essas variações dentro do complexo podem auxiliar a explicar o fato de existir manifestações clínicas tão diferentes da LV (LAINSON & RANGEL, 2005). Estudos da saliva de *L. longipalpis* de colônias diferentes podem evidenciar essa correlação. A saliva de *L. longipalpis* contém um potente peptídeo vasodilatador denominado maxadilan (LERNER et al., 1991). A forma visceral da leishmaniose é afetada pela quantidade de maxadilan, pois *L. longipalpis* da Costa Rica, com pouca quantidade dessa substância e infectado com *L. chagasi*, causa somente lesões cutâneas. Ao contrário, *L. longipalpis* do Brasil e da Colômbia têm maior quantidade de maxadilan, ocasionando uma visceralização dos parasitas, induzindo à Leishmaniose visceral (WARBURG et al., 1994).

2.2.1 Ciclo do parasito no vetor

O ciclo de *Leishmania* spp. no flebotomíneo inicia-se após a ingestão de sangue contendo macrófagos infectados com amastigotas. No trato digestivo do flebotomíneo, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas dotadas de flagelo curto. Essas formas são encontradas no sangue recém ingerido (24 a 28 horas após o repasto sanguíneo) e ficam encobertas por uma matriz peritrófica que as protege da ação das enzimas digestivas. Essa matriz fornece proteção por tempo necessário para que cerca de 50% das procíclicas se diferenciem em formas mais resistentes enquanto que a outra metade da carga parasitária é destruída pelas proteases nos primeiros 2 dias após a infecção do flebotomíneo. As procíclicas sobreviventes se multiplicam e se diferenciam em nectomonas, formas delgadas e grandes do parasito que escapam do confinamento da matriz peritrófica pela ação das quitinases para se fixarem às células epiteliais do intestino médio. As quitinases são secretadas tanto pelo parasito como pelo flebotomo. As leptomonas, formas menores, surgem a partir das nectomonas e sofrem a segunda multiplicação do ciclo. Finalmente, duas fases são observadas na válvula estomacal: haptomas e metacíclicas. As haptomonas, cuja forma precursora ainda não está esclarecida (nectomonas ou leptomonas), são formas com curto flagelo, imóveis e que se mantêm aderidas à válvula estomacal. É provável que nesse estágio o parasito produza quitinases que irão degradar a cutícula que reveste a válvula estomacal. A degradação da válvula prejudica a dinâmica alimentar do flebotomo, resultando em um maior período de repasto sanguíneo e,

consequentemente, favorecendo a transmissão. As formas metacíclicas, estágio infectante, são encontradas abaixo da válvula estomacal e são altamente adaptadas para a transmissão bem sucedida ao hospedeiro vertebrado. Elas têm um corpo pequeno com um flagelo alongado, são velozes e resistentes à lise mediada pelo complemento (KAMHAWI et al., 2006).

Fosfoglicanos secretados pelos parasitas formam um gel que preenche o lúmen do intestino na região torácica prejudicando a alimentação do flebótomo. Esse fenômeno é chamado de *Blocked fly*. Os parasitos que colonizam a parte anterior do intestino limitam o fluxo do sangue ingerido e causam um retorno no fluxo que transporta os parasitos até o aparelho bucal do inseto resultando na sua deposição na pele do hospedeiro. Este tenta se alimentar várias vezes e regurgita aproximadamente 1000 promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado (ROGERS et al., 2004; VOLF et al., 2004).

O tempo aproximado necessário para que o parasito complete seu desenvolvimento no flebotomíneo é de 6 a 9 dias, dependendo da espécie. Pouco se sabe sobre os efeitos da infecção por *Leishmania* spp na longevidade e fecundidade do flebotomíneo (KAMHAWI et al., 2006).

Vale ressaltar que o crescimento parasitário só será abundante se, após o repasto sanguíneo infectante, a fêmea vier a alimentar-se de sucos vegetais ou de substâncias açucaradas. Se, em lugar disso, houver nova refeição de sangue, por volta do quarto ou quinto dia, os flagelados degeneram ou a infecção torna-se leve. Assim, será improvável que os parasitos possam ser inoculados em novos hospedeiros pela picada dos insetos (REY, 2008).

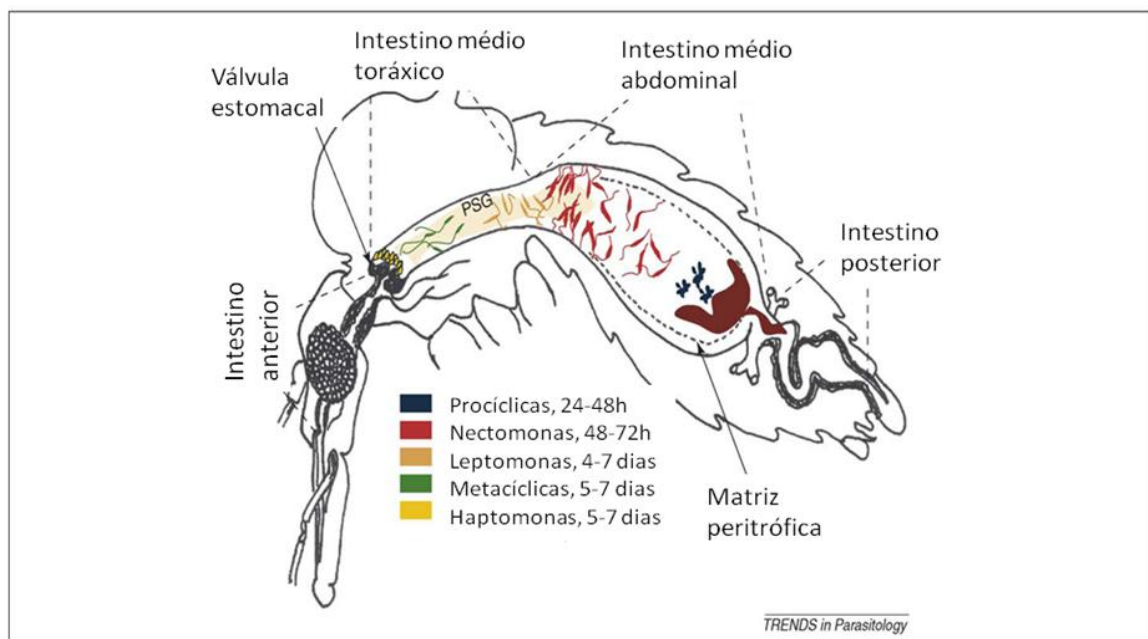


Figura 2: Ciclo de *Leishmania* spp em vetor competente.

Fonte: KAMHAWI (2006)

2.2.2 Estudos moleculares em *Lutzomyia longipalpis*

Muitos estudos moleculares envolvendo *L. longipalpis* têm objetivado evidenciar as diferenças existentes entre diferentes populações dessa mesma espécie. Foi demonstrado que diferenças de padrão de sons de acasalamento entre populações brasileiras de *L. longipalpis* são equivalentes ao nível de divergência molecular encontrados no locus *cacophony* dessas populações (SOUZA et al., 2004). Em outros trabalhos semelhantes utilizou-se loci e genes polimórficos, como o gene mitocondrial ND4 e o Periodicity gene, para evidenciar as variações genéticas entre as colônias (SOTO et al., 2001; BAUZER et al., 2002; WATTS et al., 2002). Watts et al. (2002) concluem que as diferenças genéticas dentro do complexo *L. longipalpis* pode ser explicadas pela separação geográfica e Bottecchia et al. (2004) discute acerca de um provável início de processo de especiação.

Outra linha de pesquisa busca o entendimento molecular da fisiologia do inseto com enfoque no trato digestivo e nas interações com parasitos do gênero *Leishmania* (RAMALHO-ORTIGÃO et al., 2007; JOCHIM et al., 2008). Ramalho-Ortigão et al. (2007) identificaram e seqüenciaram um cDNA codificante da subunidade C da ATPase Vacuolar (V-ATP) de *L. longipalpis*. Essa enzima é encontrada tanto no citoplasma como na membrana plasmática das células do aparelho gastrointestinal de insetos. Ela é responsável pelo transporte de prótons H^+ acidificando vesículas citoplasmáticas e vacúolos (HARVEY, 1992). A bioquímica e biologia molecular descrevem a V-ATP como sendo extraordinariamente conservada. A enzima possui o complexo V_0 (transmembranal) e complexo V_1 (citoplasmático). O complexo V_0 é composto por 6 subunidades: *a*, *c*, *c'*, *c''*, *d* e *e*. O complexo V_1 é formado pelas subunidades A, B, C, D, E, F, G e H, sendo a C, a única subunidade que é liberada no citoplasma após a dissociação da enzima (WIECZOREK et al., 2000; CIPRIANO et al. 2008). A Figura 3 mostra as estrutura tridimensional da V-ATP na forma de holoenzima ativa e após a dissociação dos dois complexos.

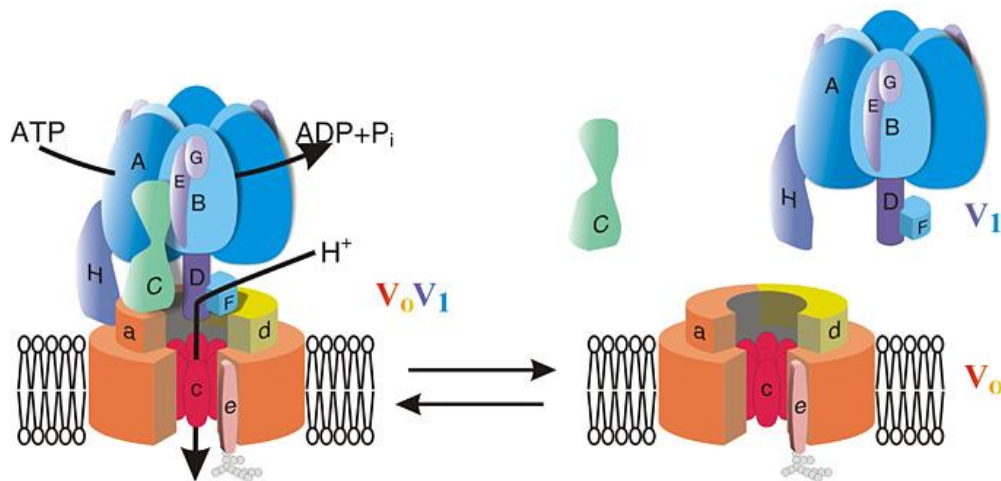


Figura 3: Estrutura da V-ATP na forma de holoenzima (esquerda) e dissociada (direita).

Fonte: <http://www.grako837.de>

2.3 Os parasitos

Os agentes causais da leishmaniose visceral são protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e complexo “*Leishmania donovani*”. Durante seu ciclo vital, os parasitos alternam sua forma entre amastigota e promastigota, onde a forma amastigota é encontrada dentro de células do sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro vertebrado e a forma promastigota se desenvolve no tubo digestivo de hospedeiro invertebrado. Os parasitos são de tamanho pequeno (amastigotas com cerca de 2,1µm de diâmetro) e mostram forte tendência a invadir as vísceras. Assim como os demais kinetoplastideos, as leishmânias possuem uma organela incomum situada diante do núcleo conhecida como cinetoplasto e que possui DNA distinto do DNA genômico (REY, 2008).

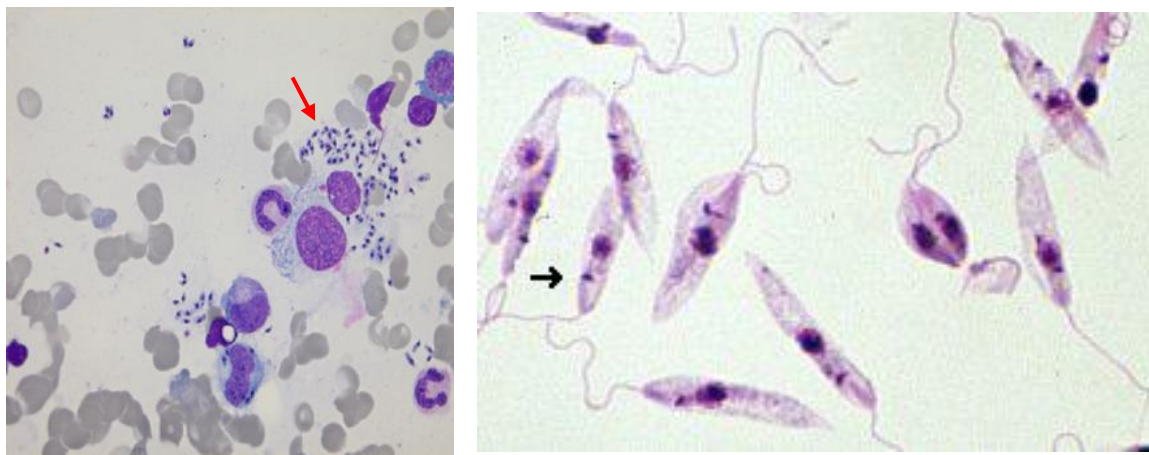


Figura 4: Amastigotas (esquerda) e promastigotas (direita) de *Leishmania* spp. A seta vermelha mostra a localização de amastigotas parasitando macrófago. A seta preta indica a localização do cinetoplasto.

Fonte: <http://picsicio.us> e <https://www.msu.edu/course/zol>

Na Índia e no leste da África, a doença é causada por *L. donovani*. O parasito infecta indivíduos adultos e é transmitida homem a homem através do vetor. Na Europa e norte da África, a doença atinge sobretudo as crianças e o cão atua como reservatório, sendo o agente etiológico a espécie *L. infantum*. (LUKES et al., 2007 e REY, 2008). Nas Américas, a única espécie descrita como causadora da leishmaniose visceral tem sido *L. chagasi*, que afeta crianças e adultos e tem o cão como principal reservatório doméstico da doença. Entretanto, pesquisas baseadas em estudos com métodos enzimáticos e genéticos mostram que as diferenças entre amostras de *L. infantum* e *L. chagasi* de diversas procedências são tão restritas que alguns autores não as diferenciam (MAURICIO et al., 1999; MAURICIO et al., 2000).

2.3.1 Características moleculares de *Leishmania* spp

Estudos recentes revelaram que *L. major* e *L. infantum* têm 36 cromossomos, enquanto *L. braziliensis* possui apenas 35. O tamanho do genoma haplóide de *L. infantum* é de aproximadamente 33 megabases (Mb), com 8.145 genes identificados (PEACOCK et al., 2007). De acordo com Ranasinghe et al. (2008), a quantidade de DNA total em um parasito é de aproximadamente 83,4fg, onde cerca de 15% corresponde ao DNA do cinetoplasto.

2.3.2 kDNA

O DNA presente no cinetoplasto (kDNA) possui arranjos de dezenas de maxicírculos e milhares de minicírculos que juntos, formam uma rede compacta de DNA, o kDNA (BREWSTER et al., 1998). Os minicírculos representam 95% do kDNA (RAY, 1987). Cada minicírculo possui cerca de 800 a 1200 pb, sendo de aproximadamente 120 a 200 pb uma região conservada dentre os cinetoplastídeos. O restante da molécula corresponde a uma região variável que apresenta diferenças inclusive entre cepas de uma mesma espécie (CAVALCANTI, 2008).

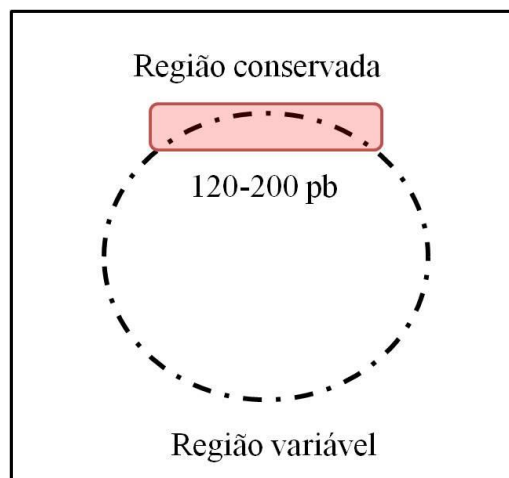


Figura 5: Representação esquemática de minicírculo.

Fonte: adaptada de CAVALCANTI (2008)

2.3.3 RNA ribossomal 18S

O gene que codifica a subunidade menor do RNA ribossomal (18S) é usado em estudos taxionômicos e diagnósticos de espécies do gênero *Leishmania* (FERNANDES et al., 1993; MEIDE et al., 2008). Cada parasito contém múltiplas cópias desse gene e o número de cópias do 18S presente na célula é maior que 10^4 (MEIDE et al., 2005). Inga et al. (1998) relataram que leishmânias do subgênero *Viannia* possuem de 20 a 40 cópias do gene que codifica o 18S. Por outro lado, Meide et al. (2005) afirmam que *L. donovani* e *L. guyanensis* possuem cerca de 160 cópias desse mesmo gene tanto na forma amastigota como promastigota. Estudos envolvendo quantificação de *L. infantum* em amostras de sangue periférico humano também se baseiam em 160 cópias por parasito (PIZZUTO et al., 2001). De forma geral, o gene é quase completamente

homólogo em todas as espécies de *Leishmania*, aumentando o seu valor no diagnóstico clínico (MEIDE et al., 2008).

2.3.4 Polimerase alfa

DNA polimerases são enzimas envolvidas na replicação e reparo do DNA. O gene que codifica a DNA polimerase alfa (Pol α) em espécies do gênero *Leishmania* possui apenas uma cópia por parasito (CROAN, 1997). Esse gene vem sendo utilizado para quantificação de *L. infantum* e *L. chagasi* através de PCR em tempo real (BRETAGNE et al., 2001; RANASINGHE et al., 2008).

2.4 Diagnóstico da infecção do flebotomíneo

A pesquisa de flagelados no tubo digestivo do vetor e a identificação da espécie do parasito era realizada por observação microscópica após dissecação, tentativa de isolamento do agente proveniente de insetos em meios de cultura e análises do seu perfil bioquímico (KREUTZER et al., 1987; PAIVA et al., 2007). Porém, fêmeas de flebotomíneos também são hospedeiras de algumas espécies de *Trypanosoma* e *Endotrypanum*, que passam por um estágio de promastigota indistinguível das leishmanias, complicando, sobremaneira, o diagnóstico microscópico e o isolamento em cultura (PAIVA et al., 2007). O desenvolvimento de técnicas moleculares permitiu diagnosticar doenças infecciosas baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta técnica tem permitido identificar várias espécies de parasitos, tendo grande valor em estudos envolvendo a detecção de *Leishmania* spp em flebotomíneos (PAIVA et al., 2006).

2.5 Reação em Cadeia da Polimerase

A PCR resulta na amplificação seletiva de uma determinada região de uma molécula de DNA cujas sequências nas bordas da região selecionada sejam conhecidas. Essas sequências de oligonucleotídeos, conhecidos como iniciadores ou *primers*, delimitam a região a ser amplificada. A amplificação é feita pela DNA polimerase I (Taq), uma enzima termoestável (BROWN, 1999). Um ciclo de PCR consiste em três fases: desnaturação do DNA molde, ligação dos *primers* e polimerização do DNA. Na primeira etapa faz-se a separação das cadeias de dupla hélice de DNA através do calor. A temperatura chega a cerca de 95°C. Esta separação é essencial

para que, na segunda fase, dois iniciadores se liguem às sequências dos pares de bases complementares da cadeia molde. Nessa etapa a temperatura diminui até 45 a 65°C. Na terceira fase, ocorre a extensão da cadeia e polimerização dos nucleotídeos complementares ao DNA molde à temperatura de aproximadamente 75°C (Figura 6). Este processo é então repetido por 25 a 40 ciclos (GLICK, 1998).

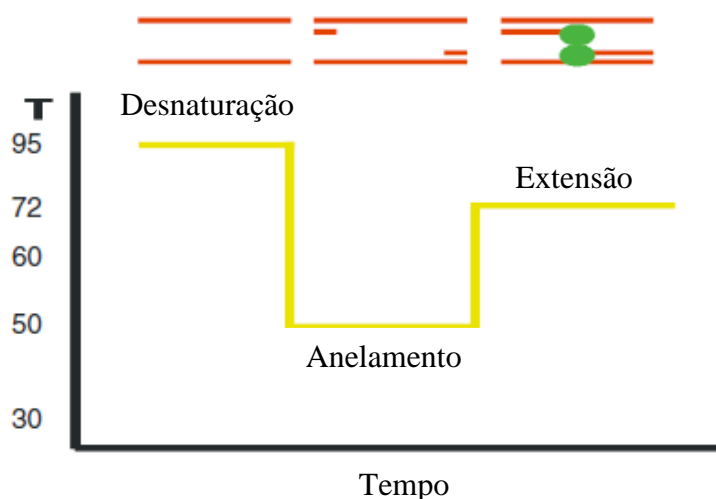


Figura 6: Variação da temperatura (°C) durante um ciclo de PCR.

Fonte: Adaptada de Kubista et al. (2006)

2.5.1 PCR em tempo real

No início da década de 90 estudos passaram a explorar a atividade exonucleásica da taq polimerase para o desenvolvimento de sondas TaqMan (HOLLAND et al., 1991). Em 1992, Higuchi e colaboradores passaram a explorar a capacidade quantitativa da PCR utilizando o brometo de etídio (HIGUCHI et al., 1992). Tais estudos promoveram o surgimento da PCR em tempo real (qPCR). Esse sistema é baseado no uso de corantes ou sondas fluorescentes que permitem o monitoramento em tempo real do produto amplificado. Um corante bastante utilizado é a SYBR Green I, que se liga inespecificamente a fitas duplas de DNA geradas durante a amplificação. Trata-se de uma cianina assimétrica que, livre em solução não emite fluorescência, mas ligada a moléculas de DNA de fita dupla emite um forte sinal luminoso. Outra forma de gerar a fluorescência é o uso de uma sonda dirigida especificamente a uma região interna da sequência que se deseja amplificar, um exemplo deste sistema é a sonda TaqMan (CAVALCANTI, 2008). A análise da emissão de luz é feita por um detector de sinal

luminoso e um amplificador de sinal que traçam um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo da PCR. O ciclo onde o sinal de amplificação exponencial atinge uma intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção (*Threshold*) é denominado *Ct* e, o momento em que o *Ct* é ultrapassado está diretamente relacionado à quantidade de DNA amplificado (MORTARINO et al., 2004).

A análise dos resultados de um ensaio de qPCR é feita por meio dos gráficos gerados no computador interligado ao termociclador. A PCR em tempo real permite, basicamente, a realização de três tipos de ensaios: quantificação absoluta, quantificação relativa e discriminação alélica. O ensaio de quantificação absoluta baseia-se na análise da curva-padrão. A curva-padrão relaciona-se às concentrações de DNA padrão. É por meio destes dados, ou seja, quantidades conhecidas de DNA, que o *software* efetua a quantificação de DNA alvo nas amostras em teste. A curva-padrão também fornece o coeficiente angular da reta (*slope*), composta pelos pontos da curva. Este dado será importante para o cálculo da eficiência da amplificação. *Slope* de -3,3 relaciona-se a uma eficiência de 100% indicando que o número de moléculas amplificadas dobra a cada ciclo da PCR (KUBISTA et al., 2006; CAVALCANTI, 2008). No ensaio de quantificação relativa, são usadas equações que envolvem o valor de *Ct* da amostra, de um calibrador e de um gene de referência (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

As características da PCR em tempo real possibilitam a eliminação da etapa laboriosa pós-amplificação (preparo do gel para eletroforese), convencionalmente necessária para visualização do produto amplificado. Desta forma, pode-se observar que as vantagens da qPCR em relação à PCR convencional são inúmeras e incluem, rapidez na obtenção dos resultados, reprodutibilidade e capacidade quantitativa (CAVALCANTI, 2008).

3 JUSTIFICATIVA

Como consequência principalmente dos desmatamentos, os flebotomíneos passaram a circular no peri e intradomicílio rural e, atualmente, urbano aumentando a incidência da LV em cães e humanos. Com a expansão da área de abrangência da doença e o aumento significativo no número de casos, a LV passou a ser considerada pela Organização Mundial da Saúde uma das prioridades dentre as doenças tropicais.

Trabalhos que identifiquem flebotomíneos infectados são importantes para o mapeamento das áreas de risco de transmissão da doença, auxiliando estudos epidemiológicos e elaboração de programas de controle da LV.

O método até então empregado para detecção do parasito no vetor era a visualização microscópica que é de baixa sensibilidade e pouco específica, pois morfológicamente as formas promastigotas não são diferenciadas. A PCR convencional é uma ferramenta de diagnóstico mais precisa que a microscopia, porém não quantifica a carga parasitária e é menos sensível que a PCR em tempo real. A PCR em tempo real é atualmente a técnica de maior sensibilidade e especificidade para esse tipo de estudo, além de permitir quantificar o número de parasitos por flebotomíneo. A determinação da carga parasitária é importante na identificação dos flebotomíneos que estão parasitados com a dose infectante mínima de leishmânias necessária para transmitir a doença. Essa dose, por sua vez, pode ser mensurada com maior precisão utilizando a PCR em tempo real.

Apesar de apresentar muitas vantagens, a aplicação da PCR em tempo real para detecção de *Leishmania* spp no vetor ainda é pouco utilizada. Além disso, por ser uma técnica empregada muito recentemente nessa área, há carência de estudos que padronizem metodologias como tipo de extração de DNA, escolha dos *primers* e nível de interferência do DNA do flebotomíneo. Essa padronização é importante para otimizar a sensibilidade na detecção e acurácia na mensuração de *L. chagasi* em *L. longipalpis*.

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- 1) A PCR em tempo real é capaz de detectar uma leishmânia em um flebotomíneo.
- 2) À medida que o número de flebotomíneos aumenta na amostra, torna-se mais difícil a detecção de pequeno número de leishmânias devido à grande quantidade de DNA de flebotomíneo presente na amostra em relação à escassa quantidade de DNA dos parasitos.
- 3) Os *primers* que amplificam kDNA têm maior sensibilidade que *primers* que amplificam DNA genômico devido ao grande número de cópias por leishmânia.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral:

Detectar e quantificar *L. chagasi* em *L. longipalpis* através de PCR em tempo real utilizando diferentes genes e diferentes métodos quantitativos a fim de padronizar a metodologia.

5.2 Objetivos Específicos:

- a) Avaliar a sensibilidade de PCR em tempo real na detecção de *L. chagasi* em diferentes *pools* de *L. longipalpis* utilizando diferentes genes;
- b) Comparar quantificação absoluta e relativa utilizando gene de cópia única e genes de múltiplas cópias;
- c) Avaliar exatidão e precisão das quantificações feitas com kDNA, Pol α e 18S;
- d) Verificar o quanto a quantidade de DNA do flebotomíneo dificulta a detecção e quantificação de *L. chagasi*

CAPÍTULO I

Detecção de *Leishmania chagasi* em *Lutzomyia longipalpis* através da PCR em tempo real:
triagem de genes e métodos quantitativos

Real-time PCR to assess *Leishmania chagasi* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: screening
of genes and quantitative methods

International Journal for Parasitology

Outubro, 2010

Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: screening of genes and assessment of quantitative methods

Diana R.B. Vasconcelos^a, Luciana M. Melo^b, Érica S. Albuquerque^b, Maria C.S. Luciano^b, Claudia M.L. Bevilaqua^{a*}

^aLaboratório de Doenças Parasitárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana, 1700, CEP 60740-000, Fortaleza, CE, Brazil

^bLaboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

* Corresponding author: PPGCV/State University of Ceará, Av. Paranjana, 1700, CEP 60740-000 Fortaleza, Ceará, Brazil. Phone. 85.31019853. Fax 85.31019840. e-mail: claudia.bevilaqua@pq.cnpq.br

Abstract

Visceral leishmaniasis is an endemic disease in Brazil. Its etiological agent is *Leishmania chagasi*, and its main vector species is the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Epidemiological studies have used conventional PCR to measure the rate of infection of sand flies collected in the field. However, real-time PCR can detect lower parasitic loads, reducing the number of false negatives and improving the quantification of *Leishmania* in the sand fly. This paper aims to compare genes with various numbers of copies to detect and quantify *L. chagasi* in various pools of *L. longipalpis* by real-time PCR. We mixed pools of 1, 10 and 30 male sand flies with various amounts of *L. chagasi*, forming groups with 50, 500, 5000 and 50000 *Leishmania* parasites. For the amplification of *L. chagasi* DNA, primers targeting kDNA and the genes encoding the polymerase α and the 18S subunit of the ribosome were employed. Specificity was determined by melting-curve analysis after each PCR and by visualization of amplicons on 1.5% agarose gels. Parasites were measured by absolute and relative quantification. The PCR analysis demonstrated the capacity to amplify the DNA equivalent of 0.004 parasites. Parasite quantification using primers targeting the polymerase α gene exhibited inaccuracy, especially in groups with reduced numbers of *Leishmania* protozoans. Conversely, in the case of primers targeting the gene encoding the 18S ribosomal subunit, the estimates were more accurate, but imprecise. The best results were observed with primers targeting kDNA, especially in the relative quantification, which indicated no interference from the pool of sand flies and demonstrated the greatest sensitivity among the genes tested as well as accurate and precise estimates.

Keywords: *Leishmania chagasi*, *Lutzomyia longipalpis*, PCR, genes

1. Introduction

Leishmaniasis is the collective name for a number of diseases caused by protozoan flagellates of the genus *Leishmania*, which has diverse clinical manifestations. Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form of the disease and is characterized by a chronic and potentially lethal pathology (WHO, 2004). VL is caused by *Leishmania donovani* in India and East Africa and by *L. infantum* in Europe and North Africa (Lukes et al., 2007). In the Americas, the only species reported to cause VL is *Leishmania chagasi*. However, recent studies employing enzymatic and genetic methods indicated that the differences between strains of *L. infantum* and *L. chagasi* from different sources are so slight that some researchers do not differentiate between them (Mauricio et al., 1999; Mauricio et al., 2000; Kuhls et al., 2005).

The natural reservoirs of the disease are foxes (*Cerdocyon thous*), opossums (*Didelphis albiventris*) and rodents (*Nectomys squamipes*), while the primary urban reservoir of VL are domestic dogs (Dantas-Torres and Brandão-Filho, 2006).

In Brazil, VL is an endemic disease with frequent outbreaks, and the phlebotomine *Lutzomyia longipalpis* is the sand fly species described as VL's main vector (Lainson and Rangel, 2005). Due to the lack of vaccines of proven efficacy and the small number of drugs used for the treatment of VL, research involving the vector remains an important component of the effort to control VL (Desjeux et al., 2004). The natural infection rate of VL is traditionally estimated by the microscopic identification of *Leishmania* protozoans in the gut of dissected sand flies. However, this method is laborious and exhibits low sensitivity. Molecular methods, such as polymerase chain reaction (PCR), are being used in epidemiological studies to determine the rate of VL infection in sand flies. End-point PCR indicates low rates of infection, ranging from 0.4% to 3.9% (Paiva et al., 2006; Oliveira-Pereira et al., 2006; Silva et al., 2008). Compared with real-time PCR (qPCR), end-point PCR is more time-consuming and presents

only qualitative data. Furthermore, qPCR products are “visualized” in real time and are quantifiable. This technique has been employed on samples from dogs and humans in studies related to the parasite load, host-parasite interactions and therapy monitoring (Mary et al., 2004; Mortarino et al., 2004; Rolão et al., 2004; Francino et al., 2006).

The major difference between the natural and the experimental infection of sand flies is the infective dose. In natural conditions, the infective dose is likely 1 to 1000 metacyclic promastigotas, but the infective dose is several million metacyclic promastigotes in experimental infections (Rogers et al., 2004). Consequently, qPCR would allow greater accuracy in the determination of the natural infective dose (Ranasinghe et al., 2008).

The detection of *Leishmania* spp. can be accomplished through PCR amplification of specific regions of kinetoplastid DNA (kDNA) minicircles and genes encoding the small (18S) subunit of the ribosome, DNA polymerase α , glucose 6-phosphate dehydrogenase, and hexokinase (Fernandes et al., 1993; Bretagne et al., 2001; Prina et al., 2007). However, to date, there is not enough information about how to optimize the use of qPCR in studies involving the detection and quantification of *L. chagasi* in the vector. In other words, there are still questions about which gene to quantify, which method of quantification to use and whether the size of the pool of sand flies affects this measurement and the sensitivity of the test.

The aim of this work was to optimize the conditions for qPCR to detect *L. infantum* in *L. longipalpis* captured in the field using two methods of quantification and using single- and multiple-copy templates.

2. Materials and methods

2.1. *Leishmania* strains and serial dilution

The *L. chagasi* strain MHOM46/LC/HZ1 was cultured at 26 °C in M199 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 40 mg/mL of gentamicin and 5% male human urine. Stationary-phase promastigotes were harvested by centrifugation (2,000 x g) and washed with phosphate-buffered saline. The solution was divided and centrifuged again (2,000 x g) to remove the supernatant. Two pellets were resuspended in the medium to enable parasite quantification using a Neubauer hemacytometer. Counts were made in triplicate for a total of six counts, with a mean \pm standard deviation of $8.056 \times 10^6 \pm 0.08$ parasites per pellet. The others pellets were stored at -20 °C until DNA extraction.

A serial dilution was performed to obtain 50,000, 5,000, 500 and 50 parasites. To determine the detection limit of the assay and to establish a standard curve that could be used for quantification, serial dilutions of *L. chagasi* DNA, with final concentrations ranging from 40,280 to 0.004 parasites per reaction, were subjected to real-time PCR analysis.

2.2. Sand flies

Male *L. longipalpis* were captured with CDC light traps in the city of Fortaleza (-03°43'02''S, 38°32'35''W), Brazil, during the year 2009. Phlebotomine sand flies were then killed with cotton balls soaked with ethyl acetate and stored in isopropanol at -20 °C. The specific identification was performed as described by Young & Duncan (1994). Sand flies were grouped in pools of 1, 10 and 30 specimens.

2.3. Samples and DNA extraction

Leishmania parasites were mixed with sand fly pools, forming groups with various quantities of insects and parasites. DNA was extracted with a Wizard SV Genomic DNA Purification System kit (Promega Corporation, USA). Briefly, samples were macerated with pistils, fragmenting the sand flies, and incubated overnight at 55 °C with a digestion solution

containing 145 mM proteinase K, 90 mM EDTA and 72 mM RNaseA. After cell debris was removed by centrifugation (2,000 x g), samples were transferred to a spin column and eluted in 100 µL of “elution buffer.” A second elution (100 µL) was made to calculate the total yield of extracted DNA. All DNA extractions were performed in triplicate and then were combined into a representative pool. DNA extracted for the standard curve of qPCR analysis of *Leishmania* parasites was quantified by spectrophotometry (Biophotometer, Eppendorf, Germany).

2.4. Genes and Primers

Sets of primers generating genomic *Leishmania* or kinetoplastic DNA amplicons were designed using unique or multiple sequences retrieved from NCBI databanks (Table 1). The alignment of sequences was accomplished with ClustalW 2 software. Oligonucleotide pairs and the similarities of primer sequences with those present in nucleotide databanks were validated using PrimerBlast software. The primer pair used to amplify the gene for the small subunit of the ribosome (18S) was described by Prina et al. (2007).

Table 1. Oligonucleotides used to amplify *Leshmania chagasi* and *Lutzomyia longipalpis* genes in real-time PCR assays.

Target gene	Organism	Accession number	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)
Pol α^a	<i>L. chagasi</i>	AF009139	CTTCGAGCCTGGCACCTCGG	95
			ACACAGCGCAGTTGCACACC	
18S ^b	<i>Leishmania</i> spp.	M81430	TACTGGGGCGTCAGAG	153
			GGGTGTCATCGTTTGC	
kDNA ^a	<i>Leishmania</i> spp.	AF103738	CTCCGGGTAGGGGCGTTC	122
			GCCCTATTTTACACCAACCCC	
V-ATP	<i>L. longipalpis</i>	EF156436	ACGTGACGAGCAAGCAGGGG GCCGAGATCGTCCGACAGGC	107

^aThe primers were designed with multiple alignments of *L. chagasi* (AF103738, AF169138, AF103739, AF169137, AF169132, AF308682) minicircle sequences for kinetoplastid DNA (kDNA) and *L. chagasi* (AF009139) and *L. infantum* (AF009147, XM_001464606) genomic sequences for DNA polymerase α (Pol α). ^bThe multy-copy gene encoding the small subunit ribosomal RNA (18S) was previously amplified by Prina et al. (2007).

2.5. Real-time PCR

Each reaction consisted of a total volume of 10 μ L, containing 5 μ L 2X Fast Start Universal SYBR Green Master (Roche), 0.3 μ M of primer mix (forward and reverse) and 0.5 μ L template. The PCR was performed in a Mastercycler EP Realplex⁴ S (Eppendorf). Each sample was analyzed in triplicate. The PCR protocol included an initial incubation at 95 °C for 10 min,

followed by 40 cycles of the amplification program at 95 °C for 15 s, 60 °C for 15 s and 60 °C for 15 s. SYBR Green fluorescent emission (530 wavelength) was measured at the end of the elongation step. The specificity of each reaction was ascertained after the completion of the amplification protocol by performing the melting procedure (55-95 °C, initiating fluorescence acquisition at 55 °C and taking measurements at 10-s intervals until the temperature reached 95 °C). The sizes of the PCR products were further confirmed by gel electrophoresis on a standard ethidium bromide-stained 1.5% agarose gel and visualized by exposure to UV light.

2.6. Analysis of PCR data

Threshold and threshold cycle (Ct) values were automatically determined by Realplex 2.2 software (Eppendorf) using default parameters. The Ct and melting temperature (Tm) data are expressed as the mean \pm sd of three measurements. The data were standardized to allow comparisons between genes and groups. The standardization of data was performed according to the following formula: CP / RP, where CP represents the number of parasites calculated for each gene and RP represents the number of parasites present in the sample (real number).

To determine the linearity (R^2) and the efficiency (E) of the PCR amplifications, standard curves were generated for each gene using serial dilutions of *Leishmania* and sand fly DNA. The amplification efficiency of each target was determined according to the equation $E = 10^{(-1/S)}$, where S is the slope of the standard curve generated from tenfold serial dilutions of purified parasite or sand fly DNA.

The interpolation of sample mean Ct values in the standard curves generated during the amplification of *Leishmania* genes was used in absolute quantification.

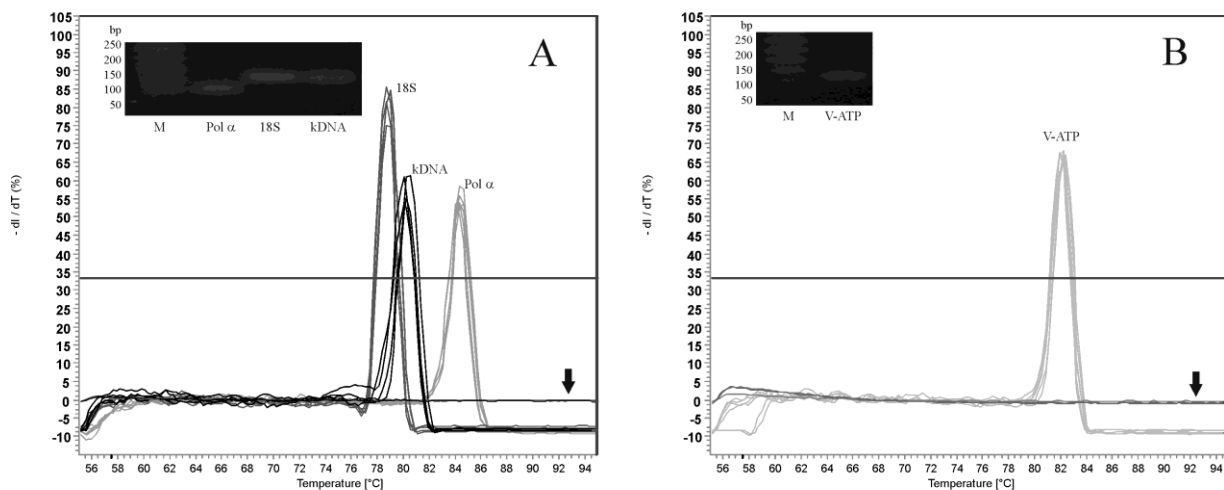
The relative quantification was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001). The Ct values for the sand fly V-ATP reference gene were used for data normalization. The samples with 500 parasites were used as calibrators.

The coefficients of variation (CV) values were calculated for each gene amplification.

3. Results

3.1. Sensitivity and Specificity

Figure 1 shows the T_m of all observations as the mean \pm sd. Only one melting peak per gene with a nearly constant value was observed for each amplification product. Visualization on an agarose gel confirmed the size of the amplified product.

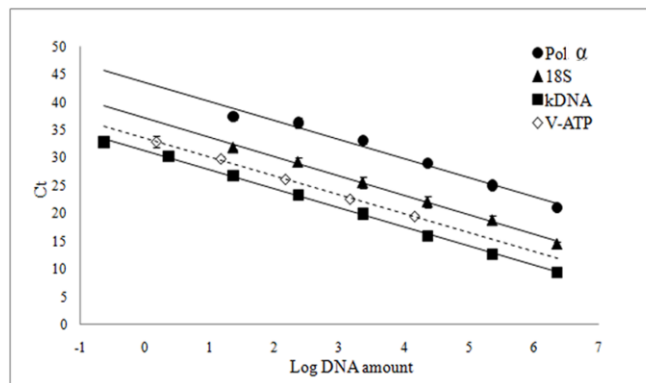


Origin of DNA template	Mean melting temperatures(°C) \pm S.D.			
	<i>Leishmania</i> genes			<i>Lutzomyia</i> gene
	Pol α	18S	kDNA	V-ATP
<i>Leishmania</i>	84.12 \pm 0.24	78.69 \pm 0.23	79.80 \pm 0.24	ND
<i>Leishmania</i> and <i>Lutzomyia</i>	83.34 \pm 1.47	78.66 \pm 0.20	79.67 \pm 0.18	82.16 \pm 0.21
Total	83.67 \pm 1.18	78.67 \pm 0.21	79.73 \pm 0.22	82.16 \pm 0.21

ND: No PCR product was detected.

Figure 1. Specificity of real-time PCR amplifications to quantify *L. chagasi* parasites in the presence or absence of sand flies during DNA extraction. Derivative melting curves of polymerase α , 18S ribosomal subunit, kDNA and V-ATP amplicons in *L. chagasi* (A) and *L. Longipalpis* (B). Negative controls (arrows) were reactions performed without DNA templates. The inserts in panels (A) and (B) show the electrophoretic analysis of the products. M: 50-bp DNA ladder.

The standard curves were established with samples ranging from 0.23 fg to 2.3 ng of *Leishmania* DNA and 1.46 pg to 14.6 ng sand fly DNA. Amplifications targeting the polymerase α and 18S genes were linear over a six-log-fold range of *Leishmania* DNA concentrations, and the assay allowed us to detect quantities as small as 23 fg of parasite DNA. One tube containing the DNA equivalent of 0.4 parasites did not generate an amplicon with primers targeting the polymerase α gene. The dynamic range of detection of kDNA was established as eight logs, and the limit of detection was 0.004 parasites in the PCR analysis (Figure 2).



Gene	Standard curve parameters			Sensitivity	
	Slope	Efficiency	Linearity (R^2)	DNA (fg) ^a	N. of <i>Leishmania</i> ^b
Pol α	-3.42	0.96	0.977	23	0.4
18S	-3.49	0.93	0.996	23	0.4
kDNA	-3.43	0.96	0.999	0.23	0.004
V-ATP	-3.40	0.97	0.999	-	-

Figure 2. Linearity, efficacy and sensitivity of real-time PCR amplifications used to quantify *L. chagasi* parasites in sand flies. Standard curves for polymerase α , 18S ribosomal subunit and kDNA sequences (full lines) were prepared through tenfold serial dilutions of a 4.6-ng/ μ L stock solution of *L. chagasi* DNA. By the same method, V-ATP (reference gene) amplifications were prepared using *L. longipalpis* DNA. The log DNA amount is in fg for *Leishmania* genes and pg for the V-ATP gene. The curve slopes, efficiency values (E) and square of Pearson correlation coefficients (R^2) were calculated. ^aDNA amount utilized in the real-time PCR reaction. ^bNumber

of *Leishmania* protozoans corresponding to the quantity of DNA, taking into account the average yield of 57.10 fg of DNA per *Leishmania* protozoan.

The reaction efficiencies were found to be high, with a strong correlation coefficient ($R^2 > 0.97$) over the concentration/dilution range studied.

3.2. *Leishmania* DNA targets and quantification

Analysis of the coefficients of variation (CV) in Figure 3 indicate the precision of Ct values obtained from qPCR designed to evaluate the influence of the number of sand flies and the *a priori* number of *Leishmania* protozoans present before DNA extractions. All genes had a low CV, but the CV of the 18S ribosomal subunit gene was the highest among the genes tested, exhibiting less precision in measurements.

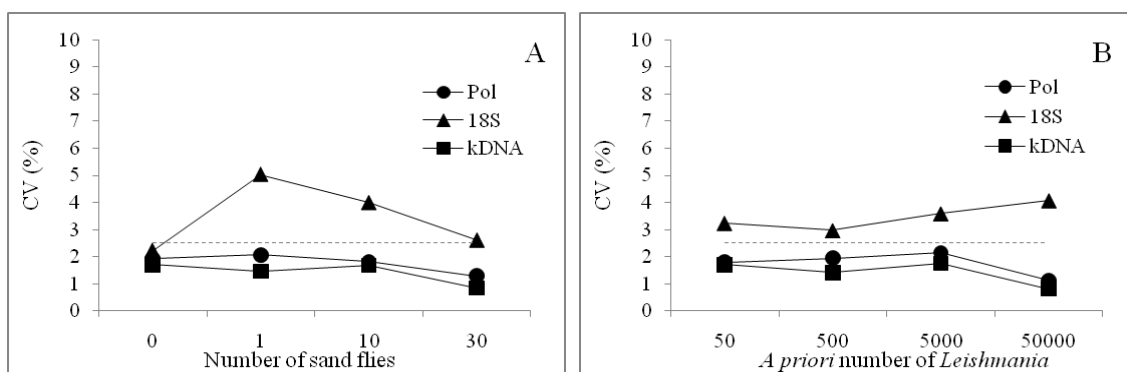


Figure 3. Precision of Ct values obtained from real-time PCR amplifications using polymerase α , 18S ribosomal subunit and kDNA *Leishmania* sequences. Influence of the number of sand flies (A) and the *a priori* number of *Leishmania* protozoans (B) present before DNA extractions on the coefficients of variation (CV) of Ct values calculated for each gene amplification.

The polymerase α gene displayed less accuracy in groups with small numbers of *Leishmania* parasites, as measured by both quantitative methods. In groups with larger numbers of parasites, absolute quantification was more accurate. In both types of quantification, the 18S ribosomal subunit gene exhibited good accuracy, regardless of the number of parasites and sand

flies. Using kDNA to estimate the number of *Leishmania* protozoans exhibited a good level of accuracy, mainly in relative quantification. No interference was observed by varying the numbers of parasites and sand flies (Figure 4).

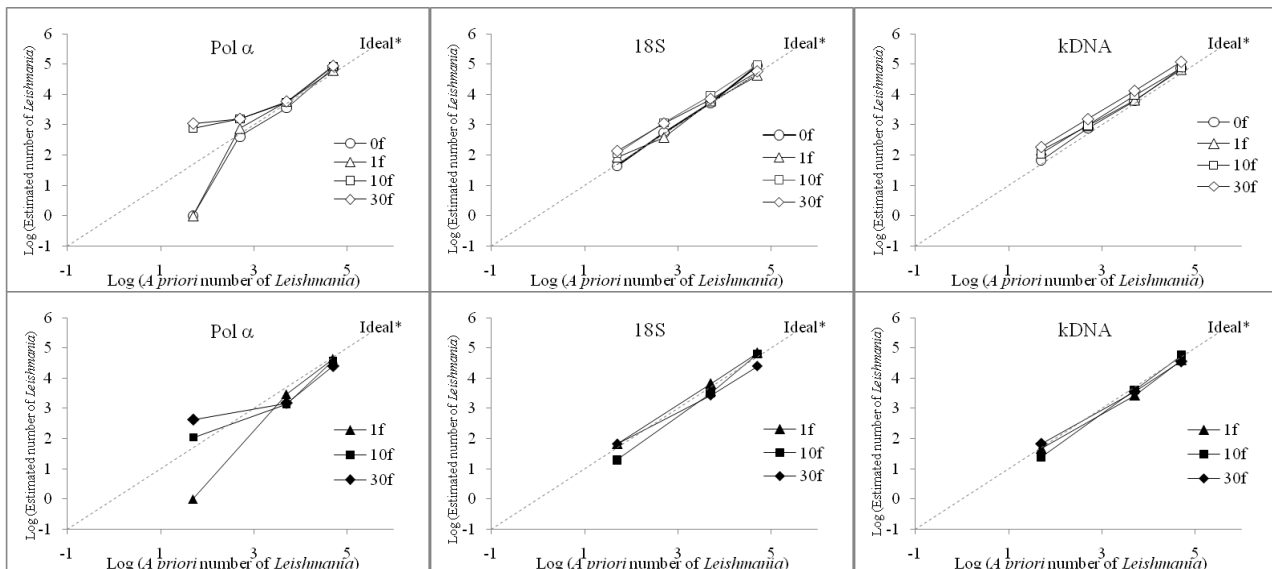


Figure 4. Influence of the number of sand flies present before DNA extractions on the accuracy of real-time PCR quantifications used to estimate the number of *Leishmania* protozoans in sand flies. The correlation between the estimated number of *Leishmania* parasites calculated by absolute (upper graphics) or relative (bottom graphics) quantification and the true value (50 to 50,000 parasites) present in the samples before the DNA extraction was measured. *Ideal: Theoretical curve represents a perfect measurement of the number of *Leishmania* protozoans in samples.

Figure 5 shows the correlation between the estimated number of *Leishmania* protozoans, as calculated by absolute or relative quantification, and the true value (50 to 50,000 parasites) present in the samples before the extraction of DNA. Relative quantification exhibited greater accuracy in measurements with the 18S ribosomal subunit and with kDNA. The evaluation of the CV of the two quantifications per gene demonstrates a high degree of variation in the measurements involving fewer parasites and targeting the polymerase α gene.

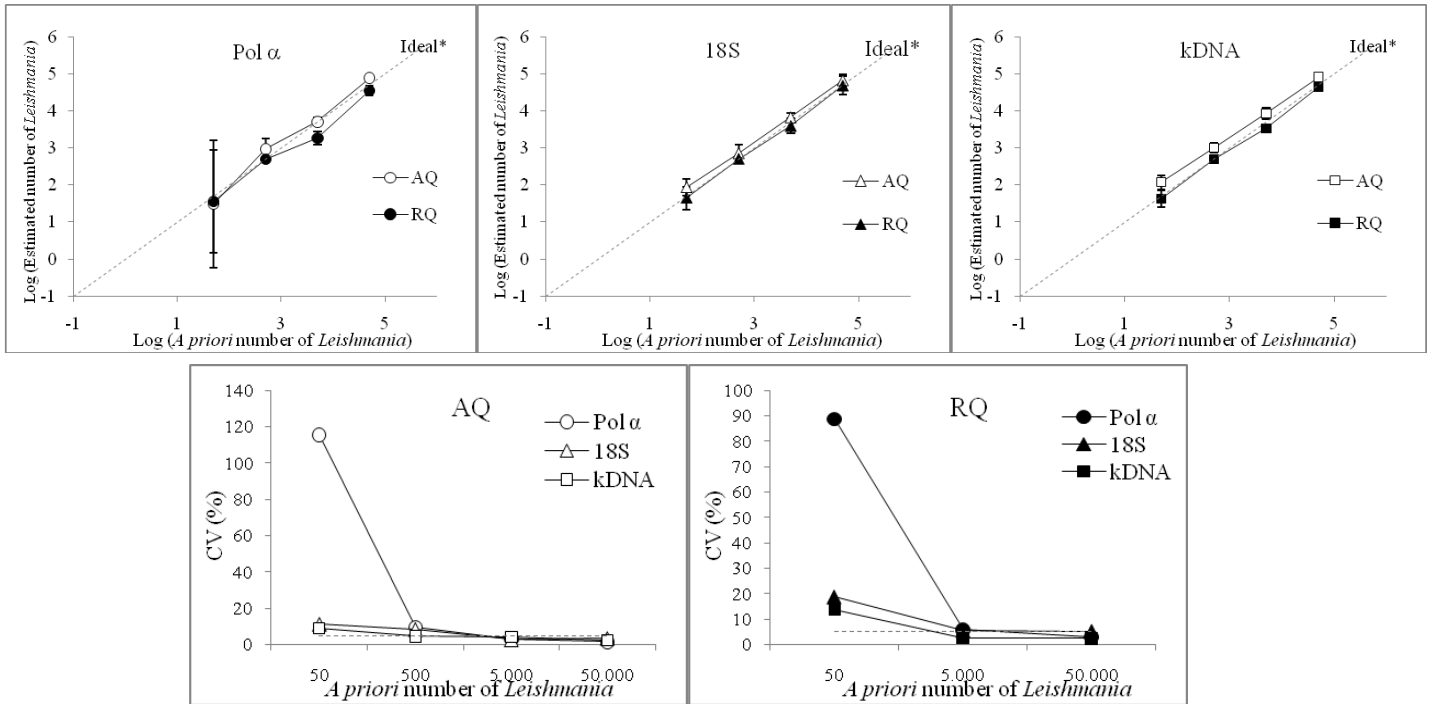


Figure 5. Accuracy and precision of real-time PCR quantification methods used to estimate the number of *Leishmania* protozoans in sand flies. The upper graphics show the correlation between the estimated number of *Leishmania* parasites calculated by absolute (AQ) or relative (RQ) quantification and the true value (50 to 50,000 parasites) present in the samples before the DNA extraction. *Ideal: Theoretical curve represents a perfect measurement of the number of *Leishmania* protozoans in samples. The graphics on the bottom of the figure show the coefficients of variation (CV) of the absolute and relative quantifications of *Leishmania* protozoans (expressed as log values) in sand flies.

4. Discussion

The aim of the present study was to validate, through qPCR, the detection of the presence of *L. chagasi* and to estimate the parasite load in the sand fly vector.

The sensitivity of parasite detection was dependent on the DNA extraction method, and we optimized a commercial kit based on silica columns. The yield of DNA extracted in the first

elution (57.1 fg) is the equivalent of 68.46% of DNA present in a *Leishmania* protozoan, according to the conversion performed by Ranasinghe et al. (2008), in which one *Leishmania* protozoan yields 83.4 fg of DNA. After adding the value obtained in the second elution to the first elution, 93.02% of the total DNA of one *Leishmania* parasite was extracted. The methods commonly used to isolate the DNA of these parasites involve the principle of the precipitation of genetic material (Martín-Sánchez et al., 2006; Paiva et al., 2007; Ranasinghe et al., 2008; Silva et al., 2008; Quaresma et al., 2009); however, kDNA, being small and lightweight (800-1000 bp), is not suited to this kind of extraction. To improve the extraction of kDNA, the present study used silica extraction columns. The kDNA-specific primers exhibited greater sensitivity than primers targeting other sequences and may be even more sensitive than the measurements indicate (0.004 parasites per reaction) because none of the tested samples yielded a negative result. Mary et al. (2004) reached the detection level of 0.0005 parasites per reaction tube. Nicolas et al. (2002) reported the detection of 0.1 parasites based on the assumption of 1 ng total DNA per *Leishmania* parasite. In the present study, this quantity of DNA (100 fg) represents nearly one whole parasite.

Being a single-copy gene, the polymerase α gene exhibited an increased level of error in the measurement of the small quantities of extracted *Leishmania* DNA because it has a 50% chance of being absent in the analyzed sample. Each parasite contains a large number (~160) of copies of the ribosomal 18S subunit gene. A qPCR assay targeting the 18S gene has been developed by Schulz et al. (2003), but its accuracy is weak when parasitemia is less than 100 parasites/mL. The present study was able to detect *Leishmania* protozoans at a concentration of 40 parasites/mL.

Ranasinghe et al. (2008) reported that, despite copy-number differences, when tested by qualitative PCR, primers targeting *Leishmania* DNA polymerase and kinetoplast origin sequences displayed similar levels of sensitivity and specificity in amplifying an expected single

product only in the presence of *Leishmania* DNA (10 pg to 100 ng); however, we used smaller quantities of DNA and demonstrated that, under these conditions, the results yielded by the two genes are quite different. Moreover, for quantitative PCR, previous studies used microscopy as the “gold standard” absolute quantification method. Here, a defined number of *Leishmania* parasites was used, and the relative quantification method was a more accurate measurement in quantifying the kDNA and 18S sequences. Targeting the kDNA sequence exhibited particularly high accuracy and precision with the relative quantification.

Ranasinghe et al. (2008) also mixed *Leishmania* DNA with sand fly DNA in equal proportions and in 100 ng sand fly DNA containing *Leishmania*. In our simulation, we attempted to replicate natural conditions more faithfully by mixing sand flies captured in the field with *Leishmania* parasites prior to DNA extraction.

The use of primers designed to amplify conserved genes from *L. longipalpis* will assist similar studies because many molecular biology studies on this species use polymorphic genes to study the species complex *L. longipalpis* (Bauzer et al., 2002; Watts et al., 2002). In further studies involving the detection of *L. chagasi* in female sand flies, it may be possible to use V-ATP gene amplification in male sand flies as a calibrator for relative quantification.

Given the above results, we conclude that estimating the number of *L. chagasi* protozoans in the vector is more reliable and sensitive when targeting kDNA sequences for relative quantification in pools of up to 30 sand flies.

Acknowledgements

Dr. Claudia M. L. Bevilaqua and Dr. Luciana M. Melo have a grant from CAPES.

6 CONCLUSÕES

Para aumentar a sensibilidade da PCR em tempo real na detecção de *L. chagasi* em flebotomíneo, a utilização do kDNA para amplificação é o primeiro passo. Além de muito sensível, a mensuração do número de leishmânias presente na amostra é mais exata e precisa que genes do DNA genômico como da Polimerase α e RNA ribossomal 18S. A quantificação relativa com o kDNA utilizando o gene da V-ATPase para normalização dos dados é um método de quantificação confiável, eficaz e não sofre interferência em *pools* de até 30 flebotomíneos, o que permite maior praticidade e confiabilidade nos resultados desse tipo de estudo.

7 PERSPECTIVAS

Outras condições devem ainda ser exploradas como a especificidade dos genes por espécie, a eficiência da extração de DNA por metodologias diferentes e sua conseqüente interferência na sensibilidade e acurácia das quantificações. Outros tamanhos de *pools* de flebotomíneos devem ser trabalhados, bem como a pesquisa de genes de referência em outras espécies de vetores. Estudos semelhantes com amostras maiores permitirão a validação das condições propostas nesse estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, B., USMA, M. C. Potential source of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 88, p. 543-549, 1994

ALEXANDER, B.; DE CARVALHO, R.L.; McCALLUM, H., PEREIRA, M.H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p.1480-1485, 2002

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p.1-88, 2004

ALVES, W. A. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, p. 25-29, 2009

BAUZER, L. G.; SOUZA, N. A.; WARD, R. D.; KYRIACOU, C. P.; PEIXOTO, A. A. The period gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. **Insect Molecular Biology**, v. 11, p. 315-323, 2002

BOTTECCHIA, M.; OLIVEIRA, S. G.; BAUZER, L. G. S. R.; SOUZA, N. A.; WARD, R. D.; GARNER, K. J.; KYRIACOU, C. P.; PEIXOTO, A. A. Genetic divergence in the *cacophony* IVS6 Intron among five Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. **Journal of Molecular Evolution**, v. 58, p. 754-761, 2004

BRETAGNE, S.; DURAND, R.; OLIVI, M.; GARIN, J.F.; SULAHIAN, A.; RIVOLLET, D.; VIDAUD, M.; DENIAU, M. Real-Time PCR as a New Tool for Quantifying *Leishmania infantum* in Liver in Infected Mice. **American Society for Microbiology**, v. 8, p. 828-831, 2001

BREWSTER, S.; ASLETT, M.; BARKER, D.C. Kinetoplast DNA minicircle database. **Parasitology Today**, v. 14, p. 437-438, 1998

BROWN, T. A. **Genética: um enfoque molecular**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

CAMERON, M. M.; PESSOA, F. A.; VASCONCELOS, A. W.; WARD, R. D. Sugar meal sources for the phlebotomine sandflies *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil. **Medicine and Veterinary Entomology**, v. 9, p. 263-272, 1995

CARVALHO, M. R.; VALENÇA, H. F.; SILVA, F. J.; PITA-PEREIRA, D.; PEREIRA, T. A.; BRITTO, C.; BRAZIL, R. P.; BRANDÃO FILHO, S. P. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (Franc, a,1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Tropica**, 2010

CAVALCANTI, M. P. Desenvolvimento e avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães. **Tese de Doutorado**. Fundação Oswaldo Cruz. Recife. Pernambuco. 2008

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 873-882, 2007

CIPRIANO, D. J.; WANG, Y.; BOND, S.; HINTON, A.; JEFFERIES, K. C.; QI, J.; FORGAC, M. Structure and regulation of the vacuolar ATPases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1777, p. 599-604, 2008

CROAN, D. G.; MORRISON, D. A.; ELLIS, J. T. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 89, p. 149-159, 1997

DA SILVA, A.L.; WILLIAMS, P.; MELO, M.N.; MAYRINK, W. Susceptibility of laboratory-reared female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) to infection by different species and

strains of *Leishmania* (Ross, 1903). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 4, p. 453 – 458, 1990

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151 – 156, 2006

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004

DOUGHERTY, M. J.; GUERIN, P.M.; WARD, R.D. Identification of oviposition attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in volatiles of faeces from vertebrates. **Physiological Entomology**, v. 20, p. 23–32, 1995

FERNANDES, A. P.; NELSON, K.; BEVERLEY, S. M. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: Perspectives on the age and origins of parasitism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 11608-11612, 1993

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, n. 137, p. 214-221, 2006

GLICK, B., PASTERNAK, J. **Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA**. ASM Press, Washington, D.C., 1998

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004

HARVEY, W. R. Physiology of V-ATPases. **The Journal of Experimental Biology**, v. 172, p. 1-17, 1992

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P. S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Bio/Technology**, v. 10, n. 4, p. 413-417, 1992

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R.; GELFAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 7276-7280, 1991

INGA, R.; DONCKER, S.; GOMEZ, J.; LOPEZ, M.; GARCIA, R.; RAY, D.; AREVALO, J.; DUJARDIN, J. C. Relation between variation in copy number of ribosomal RNA encoding genes and size of harbouring chromosomes in *Leishmania* of subgenus *Viannia*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 92, p. 219-228, 1998

JOCHIM, R. C.; TEIXEIRA, C. R.; LAUGHINGHOUSE, A.; MU, J.; OLIVEIRA, F.; GOMES, R. B.; ELNAIEM, D. E.; VALENZUELA, J. G. The midgut transcriptome of *Lutzomyia longipalpis*: comparative analysis of cDNA libraries from sugar-fed, blood-fed, post-digested and *Leishmania infantum chagasi*-infected sand flies. **BMC Genomics**, v. 9, 2008

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**. v.22, n.9, 2006

KREUTZER, R. D.; SOURATY, N.; SEMKO, M. E. Biochemical Identities and Differences among *Leishmania* Species and Subspecies. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 36, p. 22-32, 1987

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BEGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. et al. The Real Time Polymerase Chain Reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006

KUHLS, K.; MAURICIO, I. L.; PRATLONG, F. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes and Infection**, v.7, n.11-12, p.1224-34, 2005

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. Ecologia das leishmanioses: *Lutzomyia longipalpis* e a eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana (LVA) no Brasil. In EF Rangel, R Lainson (eds), **Flebotomíneos do Brasil**, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 311-336, 2003

LAINSON, R.; WARD, R.D.; SHAW, J.J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi* causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Nature**, v. 266, p. 628-630, 1977

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia Longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811-827, 2005.

LERNER, E. A.; RIBEIRO, J. M. C.; NELSON, R. J.; LERNER, M. Isolation of Maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 11234-11236, 1991

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 402-408, 2001

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. P.; KUHL, K.; TINTAYA, K. W. Q.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNÍK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 104, p. 9375–9380, 2007

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. P.; KUHL, K.; TINTAYA, K. W. Q.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNÍK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 104, p. 9375–9380, 2007

MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; GÁLLEGO, M.; BARÓN, S.; CASTILLEJO, S.; MORILLAS-MARQUEZ, F. Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera:Nematocera,Phlebotomidae). **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 527-532, 2006

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5249-5255, 2004

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genetic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, p. 237-246, 1999

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, p. 188-189, 2000

MEIDE, W. F. V.; SCHOONE, G. J.; FABER, W. R.; ZEEGELAAR, J. E.; VRIES, H. J. C.; OZBEL, Y.; FAT, R. F. M. L.; LEI'LA I. A. R. C. COELHO, L. I. A. R. C.; KASSI, M.; SCHALLIG, H. D. F. H. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5560–5566, 2005

MEIDE, W. V.; GUERRA, J.; SCHOONE, G.; FARENHORST, M.; COELHO, L.; FABER, W.; PEEKEL, I.; SCHALLIG, H. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, Real-time reverse transcriptase PCR, and Real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 73-78, 2008

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2006

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, v. 24, p. 371-377, 2008

MORTARINO, M.; FRANCESCHI, A.; MANCIANTI, F.; BAZZOCCHI, C.; GENCHI, C.; BANDI, C. Quantitative PCR in the Diagnosis of *Leishmania*. **Parassitologia**, n. 46, p. 163-167, 2004

NICOLAS, L.; PRINA, E.; LANG, T.; MILON, G. Real-time PCR for detection and quantification of *Leishmania* in mouse tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1666-1669, 2002

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; REBÊLO, J. M. M.; MORAES, J. L. P.; PEREIRA, S. R. F. Molecular diagnosis of the natural infection rate due to *Leishmania* sp in sandflies (Psychodidae, *Lutzomyia*) in the Amazon region of Maranhão, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 540-543, 2006

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F. C.; NASCIMENTO, J. C.; PIMENTA, P. F. P.; GALATI, E. A. B.; ANDRADE JR, H. F.; MALAFRONTTE, R. S. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica**, v. 99, p. 252–259, 2006

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; GALATI, E. A. B.; ANDRADE JR, H. F.; MALAFRONTTE, R. S. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania spp.* em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n.1, p. 87 – 94, 2007

PEACOCK, C. S.; SEEGER, K.; HARRIS, D. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature genetics**, v. 39, p. 839–847, 2007

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A. B.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, 2008

PIZZUTO, M.; PIAZZA, M.; SENESE, D.; SCALAMOGNA, C.; CALATTINI, S.; CORSICO, L.; PERSICO, T.; ADRIANI, B.; MAGNI, C.; GUARALDI, G.; GAIERA, G.; LUDOVISI, A.; GRAMICCIA, M.; GALLI, M.; MORONI, M.; CORBELLINO, M.; ANTINORI, S. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 357-361, 2001

PRINA, E.; ROUX, E.; MATTEI, D.; MILON, G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1307-1315, 2007

QUARESMA, P. F.; MURTA, S. M. F.; FERREIRA, E. C.; ROCHA-LIMA, A. C. V. M. ; XAVIER, A. A. P.; GONTIJO, C. M. F. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, v. 111, p. 289-294, 2009

RAMALHO-ORTIGÃO, J. M.; PITALUGA, A. N.; TELLERIA, E. L.; MARQUES, C.; SOUZA, A. A.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Cloning and characterization of a V-ATPase subunit C from the American visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* modulated during development and blood ingestion. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 509-515, 2007

RANASINGHE, S.; ROGERS, M. E.; HAMILTON, J. G. C.; BATES, P. A.; BATES, P. A.; MAINGON, R. D. C. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural

sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 875 – 882, 2008

RANGEL, E. F.; SOUZA, N. A.; WERMELINGER, E. D.; BARBOSA, A. F.; ANDRADE, C. A. Biology of *Lutzomyia intermedia* Lutz and Neiva, 1912 and *Lutzomyia longipalpis* Lutz and Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), under experimental conditions. I. Feeding aspects of larvae and adults. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 431-438, 1986

RAY, D. S. Kinetoplast DNA minicircles: high-copy-number mitochondrial plasmids. **Plasmid**, v. 17, n. 3, p. 177-190, 1987

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008

ROGERS, M. E.; ILLG, T.; NIKOLAEV, A. V.; FERGUSON, M. A. J.; BATES, P. A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, p. 463–467, 2004

ROLÃO, N.; CORTES, S.; RODRIGUES, O.R.; CAMPINO, L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal Parasitology**, v. 90, p. 1150-1154, 2004

SANTOS, S. O.; ARIAS, J. R.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, p. 315-317, 1998

SAVANI, E.S.; de OLIVEIRA CAMARGO, M.C.; CARVALHO, M.R. *et al.* - The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 120, p. 229-233, 2004

SCHULZ, A.; MELLENTHIN, K.; SCHONIAN, G.; FLEISCHER, B.; DROSTEN, C. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1529–1535, 2003

SHERLOCK, I. A.; Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 671–683, 1996

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; DIAS, E. S.; BARROS, J. C.; BRAZUNA, J. C. M. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 343-348, 2008

SOTO, S. I. U.; LEHMANN, T.; ROWTON, E. D.; BERNAL, I. D. V.; PORTER, C. H. Speciation and Population Structure in the Morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as Derived from the Mitochondrial ND4 Gene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.18, p. 84-93, 2001

SOUZA, N. A.; VIGODER, F. M.; ARAKI, A. S.; WARD, R. D.; KYRIACOU, C. P.; PEIXOTO, A. A. Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 906-913, 2004

VOLF, P.; HAJMOVA, M.; SADLOVA, J.; VOTYPKA, J. Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 1221–1227, 2004

WARBURG, A.; SARAIVA, E.; LANZARO, G. C.; TITUS, R. G.; NEVA, F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. **Philosophical Transactions: Biological Sciences** v.345, n. 1312, p. 223-230, 1994

WATTS, P. C.; BOYLAND, E.; NOYES, H. A.; MAINGON, R.; KEMP, J. Polymorphic dinucleotide microsatellite loci in the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, 2002

WHO - World Health Organization. Scientific working group on Leishmaniasis. **TDR Research Publication**, 2004

WIECZOREK, H.; GRUBER, G.; HARVEY, W. R.; HUSS, M.; MERZENDORFER, H.; ZEISKE, W. Structure and regulation of insect plasma membrane H⁺ V-ATPase. **The Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 127-135, 2000

YOUNG, D.G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in the Mexico, the West Indies, Central and the South America (Diptera:Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**, v. 54, 881p, 1994

APÊNDICES

APÊNDICE A – Alinhamentos de sequências do gene da DNA polimerase α em leishmânias mostrando a localização dos *primers* utilizados.

Primer senso **CTTCGAGCCTGGCACCTCGG**

Primer anti-senso ACACAGCGCAGTTGCACACC

Primer anti- senso (reverso complementar) **GGTGTGCAACTGCGCTGTGT**

```
L. chagasi (AF009139)      GATTACGAAGGGCAGCAACAACTTCGAGCCTGGCACCTCGGTGCTCACAC
L. infantum (XM_001464606) GATTACGAAGGGCAGCAACAACTTCGAGCCTGGCACCTCGGTGCTCACAC
L. infantum (AF009147)    GATTACGAAGGGCAGCAACAACTTCGAGCCTGGCACCTCGGTGCTCACAC
*****
```

```
L. chagasi (AF009139)      CTGCGATGCTGTTCGGCATCGCGCGACATCTACGATGTGCTGCTGCAGGGTG
L. infantum (XM_001464606) CTGCGATGCTGTTCGGCATCGCGCGACATCTACGATGTGCTGCTGCAGGGTG
L. infantum (AF009147)    CTGCGATGCTGTTCGGCATCGCGCGACATCTACGATGTGCTGCTGCAGGGTG
*****
```

```
L. chagasi (AF009139)      TGCAACTGCGCTGTGTTGTCCACAGCGGTCGTCTCACATCTCGATGTGAT
L. infantum (XM_001464606) TGCAACTGCGCTGTGTTGTCCACAGCGGTCGTCTCACATCTCGATGTGAT
L. infantum (AF009147)    TGCAACTGCGCTGTGTTGTCCACAGCGGTCGTCTCACATCTCGATGTGAT
*****
```

Sequências obtidas no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)
Endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

APÊNDICE B – Alinhamentos de sequências de kDNA (região conservada = CSB) em leishmânias mostrando a localização dos *primers* utilizados.

Primer senso **CTCCGGGTAGGGGCGTTC**

Primer anti-senso GCCCTATTTTACACCAACCCC

Primer anti- senso (reverso complementar) **GGGGTTGGTGTAAAAATAGGGC**

CSB-1

```

L. chagasi (AF103738) AATGGGGGGAAATTCCAAACTTTTCTGGTCTCCGGGTAGGGGCGTTCTG
L. chagasi (AF169138) AATGGGGGGAAATTCCAAACTTTTCTGGTCTCCGGGTAGGGGCGTTCTG
L. chagasi (AF169132) AATGGGGGGAAATTCCAAACTTTTCTGGTCTCCGGGTAGGGGCGTTCTG
L. chagasi (AF103739) AATGGGGGGAAATTCCAAACTTTTCTGGTCTCCGGGTAGGGGCGTTCTG
L. chagasi (AF169137) AATGGGGG-AAATTCCAAACTTTTCTGGTCTCCGGGTAGGGGCGTTCTG
L. chagasi (AF308682) AATGGGGGAAATTCCAAACTTTTCTGGTCTCCGGGTAGGGGCGTTCTG
***** ** * *****

```

CSB-2

```

L. chagasi (AF103738) CAAAATCGGAAAAATGGGTGCAGAAATTCCCGTTCAAAAATCGGCCAAAAA
L. chagasi (AF169138) CAAAATCGGAAAAATGGGTGCAGAAATTCCCGTTCAAAAATCGGCCAAAAA
L. chagasi (AF169132) CAAAATCGGAAAAATGGGTGCAGAAATTCCCGTTCAAAAATCGGCCAAAAA
L. chagasi (AF103739) CGAAAATCGGAAAAATGGGTGCAGAAATTCCCGTTCAAAAATCGGCCAAAAA
L. chagasi (AF169137) CGAAAATCGGAAAAATGGGTGCAGAAATTCCCGTTCAAAAATCGGCCAAAAA
L. chagasi (AF308682) CGA-----
* *

```

CSB-3

```

L. chagasi (AF103738) TGCCAAAAATCGGCTCCGGGGCGGGAAACTGGGGGTTGGTGTAAAAATAGGGCCGGGT
L. chagasi (AF169138) TGCCAAAAATCGGCTCCGGGGCGGGAAACTGGGGGTTGGTGTAAAAATAGGGCCGGGT
L. chagasi (AF169132) TGCCAAAAATCGGCTCCGGGGCGGGAAACTGGGGGTTGGTGTAAAAATAGGGCCGGGT
L. chagasi (AF103739) TGCCAAAAATCGGCTCCGGGGCGGGAAACTGGGGGTTGGTGTAAAAATAGGGCCGGGT
L. chagasi (AF169137) TGCCAAAAATCGGCTCCGGGGCGGGAAACTGGGGGTTGGTGTAAAAATAGGGCCGGGT
L. chagasi (AF308682) -----ACTGGGGGTGGTGTAAAA-A-GGCCGGGT
***** * *****

```

Sequências obtidas no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)
Endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

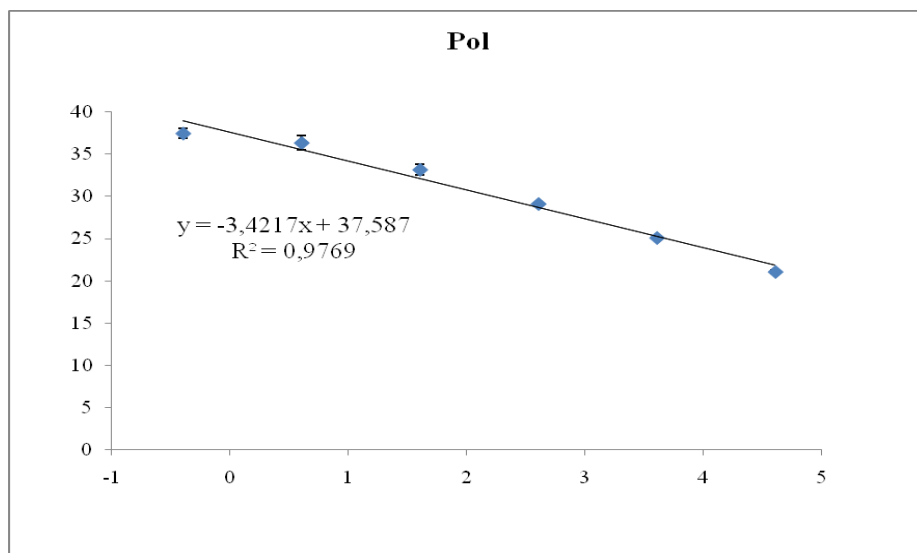
APÊNDICE C – Grupos testados

Flebotomíneos	Leishmânias	Código do grupo
0	50	0-C
0	500	0-M
0	5000	0-DM
0	50000	0-CM
1	50	1-C
1	500	1-M
1	5000	1-DM
1	50000	1-CM
10	50	10-C
10	500	10-M
10	5000	10-DM
10	50000	10-CM
30	50	30-C
30	500	30-M
30	5000	30-DM
30	50000	30-CM

APÊNDICE D – Quantificação Absoluta

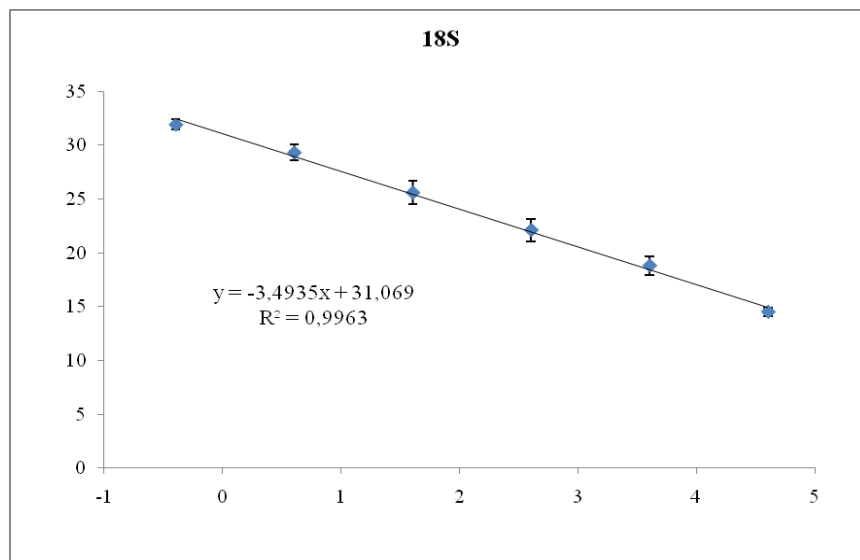
1) Utilizando gene da DNA Polimerase α

n. Fleb	n. Leish	Ct média	dp	Log Leish (x)	Leish/reacção	n. Leish na extração
0	50	0	-	-	-	0
0	500	36,51	1,29	0,315	2,1	413
0	5000	33,31	0,53	1,250	17,8	3556
0	50000	28,81	0,2	2,565	367,4	73473
1	50	0	-	-	-	0
1	500	35,62	0,33	0,575	3,8	751
1	5000	32,55	1,23	1,472	29,7	5931
1	50000	29,08	0,43	2,486	306,3	61266
10	50	35,58	0,89	0,587	3,9	772
10	500	34,52	0,49	0,896	7,9	1575
10	5000	32,67	0,61	1,437	27,4	5471
10	50000	28,58	0,44	2,632	428,9	85772
30	50	35,07	0,39	0,736	5,4	1088
30	500	34,54	0,66	0,890	7,8	1554
30	5000	32,57	0,45	1,466	29,3	5851
30	50000	28,54	0,22	2,644	440,6	88112



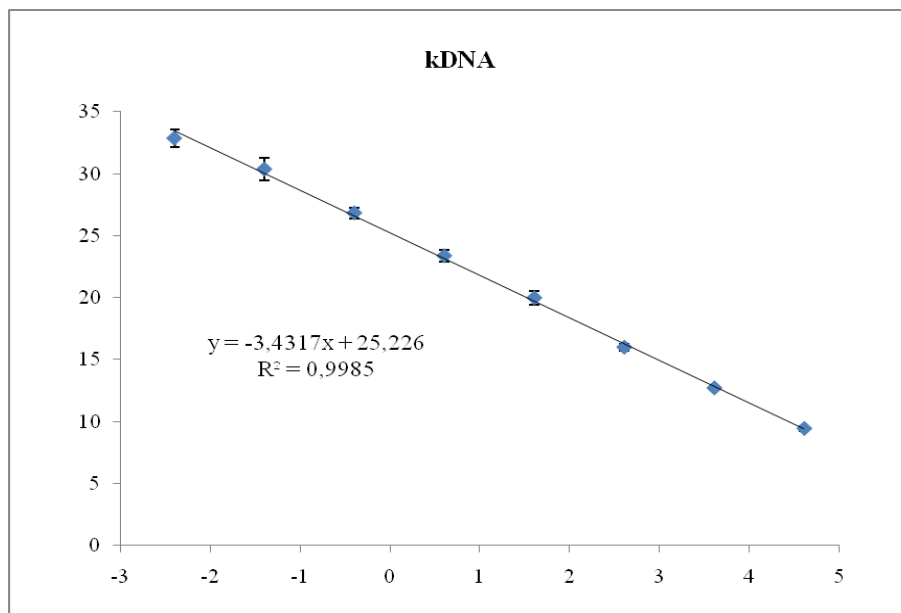
2) Utilizando gene do RNA ribossomal 18S

n. Fleb	n. Leish	Ct média	dp	Log Leish (x)	Leish/reação	n. Leish na extração
0	50	33,38	0,55	-0,662	0,22	44
0	500	29,54	0,45	0,438	2,74	548
0	5000	26,11	0,59	1,419	26,27	5254
0	50000	21,82	0,77	2,647	444,11	88822
1	50	32,39	1,02	-0,378	0,42	84
1	500	30,11	2,08	0,275	1,88	376
1	5000	25,92	1,22	1,474	29,78	5955
1	50000	22,95	1,23	2,324	210,88	42176
10	50	31,94	1,68	-0,249	0,56	113
10	500	28,4	0,54	0,764	5,81	1162
10	5000	25,28	1,25	1,657	45,40	9080
10	50000	21,73	0,84	2,673	471,25	94250
30	50	31,65	0,92	-0,166	0,68	136
30	500	28,48	0,44	0,741	5,51	1102
30	5000	25,67	0,63	1,545	35,11	7022
30	50000	22,5	0,8	2,453	283,69	56738



3) Utilizando o kDNA

n. Fleb	n. Leish	Ct		Log Leish		n. Leish na extração
		média	dp	(x)	Leish/reação	
0	50	26,84	0,78	-0,470	0,3	68
0	500	23,23	0,18	0,582	3,8	763
0	5000	20,14	0,4	1,482	30,3	6069
0	50000	16,42	0,19	2,566	368,2	73639
1	50	25,74	0,23	-0,150	0,7	142
1	500	22,98	0,27	0,654	4,5	903
1	5000	20,06	0,5	1,505	32,0	6403
1	50000	16,6	0,21	2,514	326,3	65261
10	50	26,12	0,54	-0,261	0,5	110
10	500	22,92	0,61	0,672	4,7	940
10	5000	19,48	0,3	1,674	47,2	9450
10	50000	16,4	0,99	2,572	373,2	74633
30	50	25,35	0,24	-0,036	0,9	184
30	500	22,17	0,23	0,891	7,8	1554
30	5000	18,95	0,19	1,829	67,4	13485
30	50000	15,66	0,06	2,788	613,1	122622



APÊNDICE E - Quantificação Relativa

Método $\Delta\Delta Ct$:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{calibrador}} - \Delta Ct_{\text{desconhecida}}$$

Onde, $\Delta Ct_{\text{calibrador}} = Ct_{\text{geneleish}} - Ct_{\text{genefleb}}$ e $\Delta Ct_{\text{desconhecida}} = Ct_{\text{geneleish}} - Ct_{\text{genefleb}}$

Logo, o número de leishmânias na amostra desconhecida = N. leishmânia na amostra

calibradora x $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

1) Utilizando o gene da DNA Polimerase α

Fleb	Leish	Nome	Ct média	dp	Nome	Ct média	dp	calibrador	ΔCt calibrador	ΔCt amostra	$\Delta\Delta Ct$	Fold increase	Leish calculado
1	50	Pol 1-C	0,00	0,00	VATP 1-C	23,33	0,91	Pol 1-M	11,63	-	-	0,00	0
1	500	Pol 1-M	35,62	0,33	VATP 1-M	23,99	0,18	Pol 1-M	11,63	11,63	0,00	1,00	500
1	5000	Pol 1-DM	32,55	1,23	VATP 1-DM	23,50	0,12	Pol 1-M	11,63	9,05	2,58	5,98	2990
1	50000	Pol 1-CM	29,08	0,43	VATP 1-CM	23,93	0,21	Pol 1-M	11,63	5,15	6,48	89,26	44632
10	50	Pol 10-C	35,58	0,89	VATP 10-C	21,27	0,07	Pol 10-M	12,11	14,31	-2,20	0,22	109
10	500	Pol 10-M	34,52	0,49	VATP 10-M	22,41	0,05	Pol 10-M	12,11	12,11	0,00	1,00	500
10	5000	Pol 10-DM	32,67	0,61	VATP 10-DM	21,99	0,06	Pol 10-M	12,11	10,68	1,43	2,69	1347
10	50000	Pol 10-CM	28,58	0,44	VATP 10-CM	22,73	0,31	Pol 10-M	12,11	5,85	6,26	76,64	38319
30	50	Pol 30-C	35,07	0,39	VATP 30-C	20,06	0,44	Pol 30-M	14,77	15,01	-0,24	0,85	423
30	500	Pol 30-M	34,54	0,66	VATP 30-M	19,77	0,23	Pol 30-M	14,77	14,77	0,00	1,00	500
30	5000	Pol 30-DM	32,57	0,45	VATP 30-DM	19,39	0,17	Pol 30-M	14,77	13,18	1,59	3,01	1505
30	50000	Pol 30-CM	28,54	0,22	VATP 30-CM	19,42	0,29	Pol 30-M	14,77	9,12	5,65	50,21	25107

2) Utilizando o gene do RNA ribossomal 18S

Fleb	Leish	Nome	Ct média	dp	Nome	Ct média	dp	calibrador	Δ Ct calibrador	Δ Ct amostra	$\Delta\Delta$ Ct	Fold increase	Leish calculado
1	50	18S 1-C	32,39	1,02	VATP 1-C	23,33	0,91	18S 1-M	6,12	9,06	-2,94	0,13	65
1	500	18S 1-M	30,11	2,08	VATP 1-M	23,99	0,18	18S 1-M	6,12	6,12	0,00	1,00	500
1	5000	18S 1-DM	25,92	1,22	VATP 1-DM	23,50	0,12	18S 1-M	6,12	2,42	3,70	13,00	6498
1	50000	18S 1-CM	22,95	1,23	VATP 1-CM	23,93	0,21	18S 1-M	6,12	-0,98	7,10	137,19	68594
10	50	18S 10-C	31,94	1,68	VATP 10-C	21,27	0,07	18S 10-M	5,99	10,67	-4,68	0,04	20
10	500	18S 10-M	28,40	0,54	VATP 10-M	22,41	0,05	18S 10-M	5,99	5,99	0,00	1,00	500
10	5000	18S 10-DM	25,28	1,25	VATP 10-DM	21,99	0,06	18S 10-M	5,99	3,29	2,70	6,50	3249
10	50000	18S 10-CM	21,73	0,84	VATP 10-CM	22,73	0,31	18S 10-M	5,99	-1,00	6,99	127,12	63558
30	50	18S 30-C	31,65	0,92	VATP 30-C	20,06	0,44	18S 30-M	8,71	11,59	-2,88	0,14	68
30	500	18S 30-M	28,48	0,44	VATP 30-M	19,77	0,23	18S 30-M	8,71	8,71	0,00	1,00	500
30	5000	18S 30-DM	25,67	0,63	VATP 30-DM	19,39	0,17	18S 30-M	8,71	6,28	2,43	5,39	2694
30	50000	18S 30-CM	22,50	0,80	VATP 30-CM	19,42	0,29	18S 30-M	8,71	3,08	5,63	49,52	24761

3) Utilizando o kDNA

Fleb	Leish	Nome	Ct média	dp	Nome	Ct média	dp	calibrador	Δ Ct calibrador	Δ Ct amostra	$\Delta\Delta$ Ct	Fold increase	Leish calculado
1	50	KDNA 1-C	25,74	0,23	VATP 1-C	23,33	0,91	KDNA 1-M	-1,01	2,41	-3,42	0,09	47
1	500	KDNA 1-M	22,98	0,27	VATP 1-M	23,99	0,18	KDNA 1-M	-1,01	-1,01	0,00	1,00	500
1	5000	KDNA 1-DM	20,06	0,5	VATP 1-DM	23,50	0,12	KDNA 1-M	-1,01	-3,44	2,43	5,39	2694
1	50000	KDNA 1-CM	16,6	0,21	VATP 1-CM	23,93	0,21	KDNA 1-M	-1,01	-7,33	6,32	79,89	39947
10	50	KDNA 10-C	26,12	0,54	VATP 10-C	21,27	0,07	KDNA 10-M	0,51	4,85	-4,34	0,05	25
10	500	KDNA 10-M	22,92	0,61	VATP 10-M	22,41	0,05	KDNA 10-M	0,51	0,51	0,00	1,00	500
10	5000	KDNA 10-DM	19,48	0,30	VATP 10-DM	21,99	0,06	KDNA 10-M	0,51	-2,51	3,02	8,11	4056
10	50000	KDNA 10-CM	16,40	0,99	VATP 10-CM	22,73	0,31	KDNA 10-M	0,51	-6,33	6,84	114,56	57282
30	50	KDNA 30-C	25,35	0,24	VATP 30-C	20,06	0,44	KDNA 30-M	2,40	5,29	-2,89	0,13	67
30	500	KDNA 30-M	22,17	0,23	VATP 30-M	19,77	0,23	KDNA 30-M	2,40	2,40	0,00	1,00	500
30	5000	KDNA 30-DM	18,95	0,19	VATP 30-DM	19,39	0,17	KDNA 30-M	2,40	-0,44	2,84	7,16	3580
30	50000	KDNA 30-CM	15,66	0,06	VATP 30-CM	19,42	0,29	KDNA 30-M	2,40	-3,76	6,16	71,51	35753

APÊNDICE F – Comparação das quantificações absoluta e relativa dos grupos testados. Valores calculados a partir da média das Cts.

Extração DNA		Quantificação Absoluta			Quantificação Relativa		
		Pol	kDNA	18S	Pol	kDNA	18S
n. Fleb	n. Leish	n. Leish	n. Leish	n. Leish	n. Leish	n. Leish	n. Leish
0	50	0	68	44	-	-	-
0	500	413	763	548	-	-	-
0	5.000	3.556	6.069	5.254	-	-	-
0	50.000	73.473	73.639	88.822	-	-	-
1	50	0	142	84	0	47	65
1	500	751	903	376	500	500	500
1	5.000	5.931	6.403	5.955	2.990	2.694	6.498
1	50.000	61.266	65.261	42.176	44.632	39.947	68.594
10	50	772	110	113	109	25	20
10	500	1.575	940	1.162	500	500	500
10	5.000	5.471	9.450	9.080	1.347	4.056	3.249
10	50.000	85.772	74.633	94.250	38.319	57.282	63.558
30	50	1.088	184	136	423	67	68
30	500	1.554	1.554	1.102	500	500	500
30	5.000	5.851	13.485	7.022	1.505	3.580	2.694
30	50.000	88.112	122.622	56.738	25.107	35.753	24.761

n. Fleb = Número de flebotomíneos

n. Leish = Número de leishmânias