

Diagnóstico molecular da leishmaniose visceral canina através da técnica de sonda de nanopartículas de ouro (AuNPprobes)

Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis through the technique of probe gold nanoparticles (AuNPprobes)

Janaina Marcela Assunção Rosa^{1*}; Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida²;
Ricardo César Tavares Carvalho¹; Laila Natasha Santos Brandão¹;
Letícia Camara Pitchenin¹; Icaro Sergio Magalhães Rocha¹;
Valéria Régia Franco Sousa²; Valéria Dutra²; Luciano Nakazato²

Resumo

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar comparativamente os métodos diagnósticos da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), utilizando-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), a sonda de Nanopartículas de Ouro (AuNPprobes) e a PCR em amostras de fígado. Foram analisadas 25 amostras de animais positivos pela RIFI e 10 amostras de animais negativos à PCR. A AuNPprobes utilizada baseou-se na sequência de kDNA específico para *Leishmania infantum*. Os resultados demonstraram que ao ser comparada com a RIFI a AuNPprobes apresentou sensibilidade e especificidade de 56% e 80%, respectivamente. Já ao ser comparada à PCR, a AuNPprobes apresentou sensibilidade de 68% e especificidade de 81%. A AuNPprobes pode ser uma alternativa aos métodos de diagnósticos tradicionais (PCR e RIFI), devido a sua facilidade de execução, rapidez, baixo custo e necessidade de pouca infraestrutura laboratorial.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, nanopartículas de ouro, diagnóstico, cães

Abstract

The aim of this study was to comparatively evaluate the diagnostic methods of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL), using the indirect immunofluorescence assay (IFA), the probe Gold Nanoparticles (AuNPprobes) and PCR in liver samples. We analyzed 25 samples of animals positive by IFA and 10 samples from animals negative to PCR. The probe AUNP used was based on specific sequence for *Leishmania infantum* kDNA. The results showed that when compared to the IFA serology the AuNPprobe showed a sensitivity and specificity of 56% and 80%, respectively. When compared to PCR method, the AuNPprobe had a sensitivity of 68% and specificity of 81%. The AuNPprobe can be an alternative to traditional diagnostic methods (PCR and IFA) due to its ease of implementation, immediate result, low cost and little need for laboratory infrastructure.

Key words: Canine visceral leishmaniasis, gold nanoparticles, diagnosis, dogs

¹ Discentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, MT. E-mail: janarosavet@yahoo.com.br; ricardo_carvalho88@hotmail.com; l_natasha@hotmail.com; leticia_lectamara@hotmail.com; icarosmrocha@hotmail.com

² Profs. do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, UFMT, Cuiabá, MT. E-mail: arleferreir@gmail.com; regia@ufmt.br; valdutra@ufmt.br; lucnak@ufmt.br

* Autor para correspondência

Introdução

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença de caráter zoonótico causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (SHAW, 2006) e transmitida pelos flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* e *L. cruzi*. (DANTAS-TORRES, 2007). O cão é o principal reservatório da doença, estando intimamente relacionado aos casos humanos por atuar como fonte de infecção para o vetor, além de estar envolvido na dispersão da doença para áreas não endêmicas (MONTEIRO et al., 2005).

A infecção canina geralmente antecede o surgimento de casos humanos, sendo ainda, mais prevalente que a doença humana. Os cães possuem as condições necessárias para serem reservatórios de *L. infantum* por serem altamente susceptíveis à infecção, por apresentarem intenso parasitismo cutâneo e também pelo seu convívio junto ao homem (DANTAS-TORRES, 2007).

O estado de Mato Grosso é considerado como região endêmica para a leishmaniose visceral e tegumentar, observando-se ao longo dos anos um aumento no número de casos, bem como expansão para áreas consideradas não endêmicas. Em Cuiabá, estudos de prevalência da Leishmaniose Visceral Canina demonstraram índices de 64% (MOURA et al., 1999), 8,4% (MESTRE; FONTES, 2007), 3,4% (ALMEIDA et al., 2009) e 38% (ALMEIDA; MENDONÇA; SOUSA, 2010).

O Ministério da Saúde preconiza a eutanásia de cães reagentes em inquéritos sorológicos como forma de controle da doença. Estudos que avaliaram o sacrifício de cães não foram associados à redução da incidência humana e canina no Brasil (NUNES et al., 2010) e a possibilidade de reação sorológica cruzada e a ocorrência de co-infecção com outros tripanosomatídeos tem sugerido a utilização de ferramentas diagnósticas mais precisas (ALVES; BEVILACQUA, 2004; NUNES et al., 2010).

As Nanopartículas têm sido utilizadas como sondas de sinalização para a detecção ultrasensível de DNA podendo ser usada a campo. Entre os

nanomateriais, as nanopartículas de ouro têm sido amplamente utilizadas para a detecção de ácidos nucleicos por muitos grupos de investigação de *Escherichia coli* (BAKTHAVATHSALAM; RAJENDRAN; MOHAMMED, 2012) e *Mycobacterium* sp (LIANDRIS et al., 2009), principalmente devido a sua propriedade óptica e capacidade de funcionalizar com uma variedade de biomoléculas.

Desta forma este trabalho tem por objetivo desenvolver um teste diagnóstico simples e de baixo custo para a Leishmaniose Visceral Canina através da hibridação de ácidos nucleicos por sondas de Nanopartículas de ouro em amostras de fígado de caninos sororreagentes para LV.

Material e Métodos

Amostras e extração de DNA

Foram testadas amostras clínicas (fígado) obtidas por necrópsia de 25 cães sororreagentes para leishmaniose visceral, pelo método de imunofluorescência indireta realizada por Torres (2012).

Foram testadas também 10 amostras de fígado de animais negativos para LVC previamente testadas por PCR convencional específico para *Leishmania infantum* sendo este considerado o nosso grupo controle. A extração de DNA das amostras de tecidos e dos microrganismos foi realizada pelo método de fenol/clorofórmio conforme descrito por Almeida, Mendonça e Sousa (2010) e a quantificação realizado por espectrofotometria (A_{260nm}) conforme Sambrook e Russel (2007).

Preparo da Nanopartícula de ouro

As nanopartículas de ouro foram preparadas pelo método de redução de citrato descrito por Grabar et al. (1995). Resumidamente, 250 ml de cloreto de ouro (HAuCl₄) a 1mM foi levado a uma fervura em agitação, em seguida adicionou-se 25 mL de

citrato de sódio (38,8 mM), ficando esta solução sob agitação contínua durante 15 min. A solução foi resfriada à temperatura ambiente e armazenada em local escuro até o uso.

Desenho da sonda

A sequência da sonda foi desenhada com base na região conservada do minicírculo kDNA de *L. infantum* referenciada no Genbank-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e a especificidade foi verificada pelo alinhamento com sequências de outras espécies de *Leishmania* e Tripanosomatídeos pelo programa Clustal X. O seguinte oligonucleotídeo marcado com grupo tiol foi utilizado: 5'—T(CH)₆GGGTGCAGAAATCCCGTTCA-3'.

Preparo da sonda

Devido ao oligonucleotídeo ser fornecido em sua forma protegida com uma ligação dissulfeto para minimizar o potencial de oxidação e esta ligação resultar em dímero de oligonucleotídeo foi realizada a redução da ligação dissulfeto com Ditionotrietoil (DTT) conforme protocolo descrito por Doria (2010).

A remoção de subprodutos de reação DTT e eluição em tampão conjugado foi executada através de kit comercial Illustra NAP5 Columns (GE Healthcare) seguindo recomendação do fabricante.

Posteriormente foi adicionado 10 ml de Nanopartícula de ouro ao oligonucleotídeo purificado e incubado por 16 horas em temperatura ambiente sob agitação. Após as 16 horas foi adicionado 200 µl da solução AGE I a cada 20 minutos por oito vezes. A nanopartícula foi então incubada por 40 horas em temperatura ambiente sob agitação. A nanopartícula foi alíquotada em microtubos de 1,5 ml e centrifugadas por 20 minutos a 12.000 g. O sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 1 ml de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 8 e centrifugado por 5 minutos a 12.000 g. O

sobrenadante foi descartado e então a nanopartícula foi ressuspendida em 500 µl de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 8 mais 0,5 M NaCl e armazenado a -4°C.

Hibridização e detecção

Várias diluições do DNA de *L. infantum* proveniente de cultivo celular (MHOM/BR/1974/PP75) foram utilizadas para determinar o limite de detecção da Nanopartícula de ouro. Foram feitas as seguintes diluições: 200 ng, 100 ng, 50 ng e 10 ng. Foram testadas também amostras de cultivo celular de *L. braziliensis*, *Trypanosoma* sp e da bactéria *Samonella* sp para avaliar a especificidade da AuNPprobe.

Foram testadas amostras clínicas de fígado, obtido por necropsia, de 25 cães sororreagentes para anticorpos anti-*Leishmania* previamente testadas e confirmadas por Torres (2012). Foram testadas também 10 amostras de fígado de animais negativos para LVC previamente testadas por PCR convencional específico para *Leishmania infantum* sendo este o nosso grupo controle.

A hibridização foi realizada conforme protocolo descrito por Bakthavathsalam, Rajendran e Mohammed, 2012). Resumidamente, as reações foram preparadas para um volume final de 30 µl contendo 5 µl de DNA, 5,8 µl de AuNPprobe e 19,2 µl de PBS pH 8 com 0,5M NaCl. Como controle negativo utilizou-se água destilada ultrapura e como controle positivo DNA de *L. infantum*.

O programa de hibridização foi realizado nas seguintes etapas: desnaturação do DNA a 95 °C por 3 minutos, seguida pela adição de 5,8 µl de AuNP. Resfriamento do DNA a 65°C por 10 minutos. O termociclador utilizado foi da marca BIO-RAD My Cycler TM Thermal Cycler, USA.

A reação ficou a temperatura ambiente por 30 minutos. Foi adicionado 2,4 µl de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) 0,5 M e após a reação ficar à temperatura ambiente por mais 15 minutos foi

realizada leitura a olho nu e registrado o resultado como positivo (coloração rosa) ou negativo (coloração roxa). A amostra foi submetida a leitura em cubetas de quartzo em espectrofotômetro com leituras em comprimento de onda de 520 nm e 600 nm (DORIA, 2010). As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram uma razão 520/600 maior ou igual a 1.

PCR para *Leishmania infantum*

Após condução da hibridização foram realizados os testes moleculares pelo método da PCR, de acordo com o protocolo descrito por Lachaud et al. (2002), utilizando-se os iniciadores RV1- 5'-CTT TTC TGG TCC CGC GGG TAG G-3' e RV2- 5'-CCA CCT GGC TAT TTT ACA CCA-3' que amplificam um fragmento de 145 pares de bases (pb) de uma região conservada do minicírculo kDNA específica de *L. infantum*.

O tempo e as condições de amplificação de temperatura foram: desnaturação inicial a 94 ° C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos a 94 ° C por 30 segundos, 60 ° C por 30 segundos, 72 ° C durante 30 segundos e uma extensão final a 72 ° C durante 10 minutos.

A concentração dos reagentes foi de: 2 µl de tampão de reação 10X, 1 µl de MgCl₂ (na concentração de 50mM), 1 µl de primer, 4 µl de DNTP, 0,2 µl de Taq DNA Polimerase (Recombinant,

Invitrogen), 2 µl de DNA e 14,8 µl de água ultra pura.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, e observados em transluminador (300 nm), com marcador de massa molecular de 100 pb.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do índice Kappa e do teste McNemar (qui-quadrado) com o objetivo de avaliar a validade das técnicas utilizadas no estudo e medir o grau de concordância entre elas.

As análises comparativas dos exames diagnósticos foram realizadas pelo Índice Kappa de concordância, para o intervalo de confiança de 95%, sendo $\kappa < 0,4$ aceito como concordância fraca, $0,4 < \kappa < 0,7$ como boa e $\kappa > 0,7$ como ótima.

Resultados

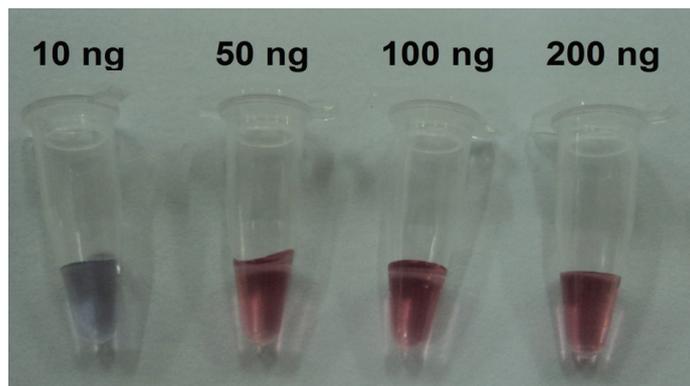
O limite de detecção da Nanopartícula de ouro macroscopicamente foi positivo a partir de uma concentração igual ou superior a 50 ng de DNA de *L. infantum* (Figura 1). As leituras e as razões das absorvâncias ($A_{520nm/600nm}$) também apresentou resultado similar, com valores acima de 1 a partir de 50ng e atingindo 1,87 com 200 ng de DNA (Tabela 1).

Tabela 1. Limite mínimo de detecção e especificidade da Nanopartícula de ouro para *L. infantum*.

Microrganismo	10ng	50ng	100ng	200ng
<i>L. infantum</i>	0,079	1,056	1,384	1,873
<i>L. braziliensis</i>	0,089	0,094	0,186	0,195
<i>Trypanosoma</i> sp	0,132	0,159	0,172	0,187
<i>Salmonella</i> spp	0,154	0,169	0,183	0,192

Fonte: Elaboração dos autores.

Figura 1. Observação Macroscópica do limite mínimo de detecção da AuNP com diluições em série de DNA de *L. infantum*.



Fonte: Elaboração dos autores.

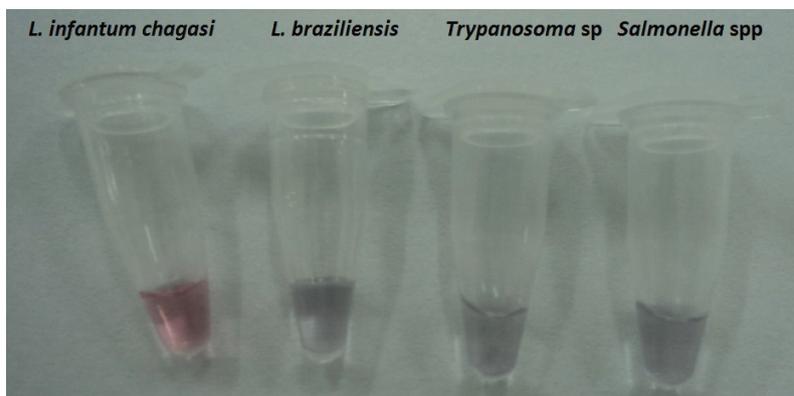
Quanto à especificidade da Nanopartícula de ouro, ocorreu somente a detecção macroscópica na amostra de *L. infantum* (Figura 2). As amostras de DNA de *L. braziliensis* e outros microrganismos foram negativos em todas as concentrações demonstrando especificidade da Nanopartícula de ouro (Tabela 1). A relação das leituras ópticas ($A_{520nm/600nm}$) foram sempre menor que 1 com media de 0,198.

Em relação às amostras clínicas, a Tabela 2 apresenta os resultados das análises realizadas com Nanopartícula de ouro, PCR e sorologia. Das 25 amostras de fígado de animais soropositivos, 14 (56%) foram positivas na Nanopartícula de ouro e 19 (76%) foram positivas ao PCR. Das 10 amostras

de fígado do grupo controle, 8 (80%) foram negativas na Nanopartícula de ouro e a PCR revelou negatividade de 100% das amostras.

Os resultados da comparação de sensibilidade e especificidade, entre a RIFI, a Nanopartícula de ouro e a PCR estão apresentados na Tabela 3. Ao analisar as amostras de fígado, assumindo a RIFI como padrão ouro, a Nanopartícula de ouro apresentou uma sensibilidade de 56% e uma especificidade de 80%. Os valores de VPP (valor preditivo positivo) e VPN (valor preditivo negativo) foram de 87,5% e 42%, respectivamente. Na análise de concordância o valor do índice kappa foi de 0,2835 o que traduz uma concordância fraca.

Figura 2. Observação macroscópica da especificidade da Nanopartícula de ouro utilizando DNA de *L. infantum*, *L. braziliensis*, *Trypanosoma sp* e *Salmonella spp*.



Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 2. Resultado comparativo das técnicas utilizadas no grupo de cães soropositivos para Leishmaniose Visceral.

AMOSTRAS (N)	RIFI N(%)	AuNPprobe N(%)	PCR N(%)
Fígado (25)	25 (100%)	14(56%)	19(76%)
Grupo Controle (10)	NR	2(20%)	0(0%)

NR: não realizado.

Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 3 Resultados dos testes de Sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos RIFI, Nanopartícula de ouro (AuNPprobe) e PCR realizados com as amostras de fígado comparados entre si pelo teste Kappa.

	TESTES		
	RIFI X AuNPprobe	RIFI X PCR	PCR X AuNPprobe
Sensibilidade	56%	76 %	68%
Especificidade	80%	100%	81%
Kappa	0,2835	0,6441*	0,4895*

*Estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$). Intervalo de confiança = 95%.

Fonte: Elaboração dos autores.

Comparando-se a RIFI e a PCR observou-se uma sensibilidade de 76% e uma especificidade de 100%. Os valores de VPP e VPN foram de 100% e 62,5%, respectivamente. Na análise de concordância o valor do índice kappa foi de 0,6441, o que traduz uma concordância boa.

Na comparação da PCR e a Nanopartícula de ouro, a Nanopartícula de ouro obteve como resultado do desempenho uma sensibilidade de 68% e uma especificidade de 81%. Os valores de VPP e VPN foram de 81,2% e 68,4%, respectivamente. Na análise de concordância o valor do índice kappa foi de 0,4895, o que traduz uma concordância boa.

Discussão

As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial de Saúde doenças emergentes ou não controladas, sendo áreas importantes de pesquisa a aquisição de novos conhecimentos sobre métodos de diagnóstico, drogas terapêuticas e planejamento de estratégias para seu controle (WHO, 2012).

O diagnóstico para a detecção da infecção em cães é normalmente realizado mediante exames clínicos, demonstração do parasita e identificação de anticorpos específicos, através de testes sorológicos como RIFI e ELISA (ALVES; BEVILACQUA, 2004). O RIFI exerceu um papel de destaque no que diz respeito ao diagnóstico da leishmaniose no Brasil, por que este teste até meados do ano de 2012 foi recomendado pelo Ministério da Saúde como padrão-ouro, tanto para diagnóstico da LVC como da Leishmaniose visceral humana, apesar do teste apresentar um elevado número de resultados falso-positivos e falso-negativos.

Dentre os métodos moleculares, a PCR é a que mais vem sendo utilizada no diagnóstico e monitoramento da leishmaniose canina (LACHAUD et al., 2002). Esta técnica baseia-se na amplificação *in vitro* de sequências de nucleotídeos específicas presentes no parasito, sendo um método sensível e específico para detectar DNA de *Leishmania* spp. em ampla gama de amostras clínicas do homem, cães, animais silvestres e insetos vetores (GOMES et al., 2008).

As características das técnicas diagnósticas são parâmetros importantes na escolha do teste a ser utilizado num programa de controle da LVC, principalmente quando a eliminação do cão positivo é uma das medidas adotadas (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

Recentemente, métodos diagnósticos baseados em Nanopartículas de ouro têm sido extensivamente utilizados para uma rápida e sensível detecção direta do *Mycobacterium* sp (BAPTISTA et al., 2006; LIANDRIS et al., 2009), *Escherichia coli* (BAKTHAVATHSALAM; RAJENDRAN; MOHAMMED, 2012) e do vírus da gripe aviária H5N1 (ZHAO et al., 2010) em amostras clínicas com elevada eficácia.

No presente trabalho o limite mínimo de detecção de DNA de *L. infantum* pela Nanopartícula de ouro foi de 50 ng de DNA. Backthavathsalam, Rajendram e Mohammed (2012) obtiveram como limite mínimo de detecção 54 ng de DNA de *E. coli* que corrobora com o resultado encontrado no presente estudo. Já Liandris et al. (2009) obtiveram como limite mínimo 18,75 ng de DNA de *Mycobacterium tuberculosis*. No entanto, Baptista et al. (2006) observaram um limite mínimo de detecção de 750 ng de DNA de *M. tuberculosis* demonstrando assim que a Nanopartícula de ouro utilizada no presente estudo se mostrou mais sensível, ou seja, necessitou de uma quantidade menor de DNA para que houvesse detecção. O motivo desta sensibilidade maior, de acordo com Ranasinghe et al. (2008), se deve ao fato da quantidade de DNA total em um parasito ser de aproximadamente 0,1 ng, onde cerca de 15% corresponde ao DNA do cinetoplasto (kDNA).

Os resultados da presente pesquisa demonstram que ao ser comparada com a RIFI a Nanopartícula de ouro se mostrou pouco sensível (56%), e com especificidade de 80%. Já ao ser comparada à PCR, a Nanopartícula de ouro apresentou sensibilidade de 68% e especificidade de 81%. A PCR ao ser comparada com a RIFI apresentou melhor

sensibilidade dos três métodos (76%) e 100% de especificidade.

Das 10 amostras de fígado que compunham o nosso grupo controle a Nanopartícula de ouro detectou duas amostras como sendo positivas. Observamos que essas amostras possuíam concentração de DNA elevada, o que pode ter impedido a agregação da Nanopartícula de ouro resultando em provável falso-positivo. Veigas (2009) verificou que a concentração de DNA e o tamanho do oligonucleotídeos à superfície Nanopartículas de ouro é um fator determinante na eficiência de detecção.

Das 25 amostras soropositivas testadas pela PCR, seis (24%) obtiveram resultado negativo o que nos leva a crer que a RIFI obteve resultados falso-positivos em 24% das amostras que foram testadas pela PCR. Desta forma, segundo recomendações do Ministério da Saúde, seis animais não portadores da enfermidade deveriam ser eutanasiados.

Segundo Ikononopoulos et al. (2003), os resultados discrepantes encontrados podem ser devido a vários fatores, entre eles: a permanência de anticorpos circulantes mesmo após a eliminação do parasita; a baixa quantidade de parasito no tecido e conseqüentemente não detectado pela PCR, inibidores da PCR presentes nas amostras e ainda devido a reações cruzadas da sorologia com outras doenças.

A RIFI, teste indicado pelo MS para levantamentos epidemiológicos e diagnósticos da LV canina até meados do ano de 2012, reúne as seguintes características: valores elevados de sensibilidade (90-100%) e valores menores de especificidade (80%). Adicionalmente é conhecido que a identificação de indivíduos falso-positivos pela RIFI se deve a reações cruzadas entre LV e duas outras importantes zoonoses: LTA e doença de Chagas (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

Segundo Nunes et al. (2010) a baixa especificidade associada à alta sensibilidade

aumenta a possibilidade do sacrifício desnecessário de cães não infectados com o agente (falso-positivo), e fomenta o discurso de profissionais de saúde que desaconselham a eutanásia de cães e a antipatia da sociedade em geral em relação ao programa de controle.

Existe um grande percentual de animais infectados assintomáticos, havendo opiniões contraditórias na literatura em relação à cura espontânea. É importante lembrar que em muitos casos os animais não apresentam sinais clínicos, mas são portadores do parasito, podendo atuar desta forma como reservatórios da LVC (REY, 2001).

Baseados nestes dados a utilização das Nanopartículas de ouro pode ser uma alternativa aos métodos de diagnósticos tradicionais (PCR e RIFI), devido a sua facilidade de execução, rapidez, baixo custo e necessidade de pouca infraestrutura.

Conclusão

Os resultados obtidos durante o presente trabalho são bastante encorajadores para a aplicabilidade da metodologia da Nanopartícula de ouro na detecção de *L. infantum*. A Nanopartícula de ouro é um teste de fácil execução, rápido e de baixo custo e com boa concordância com a PCR.

Referências

ALMEIDA, A. B. F.; FARIA, R. P.; PIMENTEL, M. F. A.; DAHROUH, M. A. A.; TURBINO, N. C. M. R.; SOUSA, V. R. F. Seroepidemiological survey of canine leishmaniasis in endemic areas of Cuiabá, State of Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 42, n. 2, p. 156-9, 2009.

ALMEIDA, A. B. P. F.; MENDONÇA, A. J.; SOUSA, V. R. F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1610-1615, 2010.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997.

Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

BAKTHAVATHSALAM, P.; RAJENDRAN, V. K.; MOHAMMED, J. A. B. A direct detection of *Escherichia coli* genomic DNA using gold nanoprobe. *Journal of Nanobiotechnology*, London, v. 10, n. 8, p. 1-10, 2012.

BAPTISTA, P. V.; KOZIOL-MONTEWKA, M.; PALUCH-OLEK, J.; DORIA, G.; FRANCO, R. Gold Nanoparticle Probe Based Assay for Rapid and Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in Clinical Samples. *Clinical Chemistry*, Washington v. 52, n. 7, p. 1433-1434, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007.

DORIA, G. M. R. P. F. *DNA nanoprobe for molecular detection*. 2010. Tese (Doutorado em Engenharia Biológica) - Especialidade Engenharia genética pela Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

GOMES, Y. M.; CAVALCANTI, M. P.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, London, v. 175, n. 1, p. 45-52, 2008.

GRABAR, K. C.; GRIFFITH-FREEMAN, R.; HOMMER, M. B.; NATAN, M. J. Preparation and characterization of Au colloid monolayers. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 67, n. 4, p. 735-743, 1995.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOLIS, V. G. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 99-113, 2003.

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection on canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.

LIANDRIS, E.; GAZOULI, M.; ANDREADOU, M.; COMOR, M.; ABZOVIC, N.; SECHI, L. A.; IKONOMOPOULOS, J. Direct detection of unamplified DNA from pathogenic mycobacteria using DNA derivatized gold nanoparticles. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 78, n. 3, p. 260-264, 2009.

- MESTRE, G. L. C.; FONTES, C. J. F. A expansão da epidemia de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998-2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 40, n. 1, p. 42-48, 2007.
- MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, L. F.; DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista Brasileira da Sociedade de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005.
- MOURA, S. T.; FERNANDES, C. G. N.; PANDOLPHO, V. C.; SILVA, R. R. Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 101-102, 1999.
- NUNES, C. M.; PIRES, M. M.; SILVA, K. M. da; ASSIS, F. D.; GONÇALVES FILHO, J.; PERRI, S. H. V. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 170, n. 1-2, p. 131-133, 2010.
- 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 si* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 102, n. 9, p. 875-882, 2008.
- REY, L. C. Leishmania e Leishmaníases: os parasitos. In: _____. *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 211-226.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular cloning - a laboratory manual*. 30th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. p. A8.19-A8.24.
- SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 577-579. 2006.
- TORRES, M. M. *Avaliação laboratorial da hemostasia e a relação da carga parasitária com a apresentação clínico-laboratorial de cães com leishmaniose visceral no município de Cuiabá*. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá.
- VEIGAS, B. M. R. *Au-Nanossondas aplicação na detecção de Mycobacterium tuberculosis e Plasmodium berghei*. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. *Leishmaniasis*. 2012. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 25 ago. 2012.
- ZHAO, J.; TANG, S.; STORHOFF, J.; MARLA, S.; BAO, Y. P.; WANG, X.; WONG, E. Y. Multiplexed, rapid detection of H5N1 using a PCR free nanoparticle based genomic microarray assay. *BMC Biotechnology*, London, v. 10, n. 74, p. 1-9, 2010.

