

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES - CPqAM  
Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Rayana Carla Silva de Moraes

**APLICABILIDADE DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PARA  
CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Leishmania***

**RECIFE**

**2015**

RAYANA CARLA SILVA DE MORAIS

**APLICABILIDADE DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PARA  
CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Leishmania***

Dissertação apresentada ao curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Milena de Paiva Cavalcanti

Co-orientador: Dr.<sup>o</sup> Fábio Lopes de Melo

**RECIFE**

**2015**

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

M827a      Morais, Rayana Carla Silva de.  
                Aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real  
                para caracterização de espécies de Leishmania / Rayana  
                Carla Silva de Morais. - Recife: [s.n.], 2015.  
                62 p.: il., tab.

                Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e  
                Biotecnologia Aplicadas à Saúde) - Centro de Pesquisas  
                Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

                Orientadora: Milena Paiva Cavalcanti; Co-  
                orientador: Fábio Lopes de Melo.

                1. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo  
                Real - métodos. 2. Leishmaniose cutânea - diagnóstico.  
                3. Leishmania. I. Cavalcanti, Milena de Paiva. II. Melo,  
                Fábio Lopes de. III. Título.

---

CDU 577.21

RAYANA CARLA SILVA DE MORAIS

**APLICABILIDADE DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PARA  
CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Leishmania***

Dissertação apresentada ao curso de  
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães,  
Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data de Aprovação \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

---

**Dr<sup>a</sup> Milena de Paiva Cavalcanti**

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães  
Dept<sup>o</sup> de Imunologia

---

**Dr<sup>a</sup> Fábio Lopes de Melo**

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães  
Dept<sup>o</sup> de Parasitologia

---

**Dr. Fábio André Brayner dos Santos**

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães  
Dept<sup>o</sup> de Parasitologia

---

**Dr<sup>a</sup> Carina Lucena Mendes Marques**

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães  
Dept<sup>o</sup> de Microbiologia

**A todos que amo.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por tudo.

A minha família por total apoio e compreensão em todos os momentos, em especial a minha mãe e ao meu noivo por toda força nos momentos mais árduos desta caminhada.

A todos os amigos e colegas que conquistei antes e durante este percurso.

A todos do laboratório, pelo convívio e amizade.

A minha equipe por toda parceria e cumplicidade em todas as horas.

A Cíntia Nascimento pela cooperação técnica.

A minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Milena de Paiva Cavalcanti, por toda paciência e ensinamentos, os quais me proporcionaram concluir essa etapa da vida profissional.

A Dr<sup>o</sup> Sinval Pinto Brandão Filho por proporcionar e incentivar o trabalho.

A todos os órgãos de fomentos pelo apoio financeiro com bolsa de cooperação técnica (Fundação de Amparo à Ciência de Pernambuco - FACEPE), bolsa de mestrado (Cooperação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) e financiamentos de projetos, tornando possível a realização do trabalho (Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq).

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães por todo suporte infra-estrutural e pela oportunidade ímpar de trabalhar nesta conceituada Instituição.

A Deus.

MORAIS, Rayana Carla Silva de. **Aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real para caracterização de espécies de *Leishmania***. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é causada por protozoários, do gênero *Leishmania*, envolvidos em um complexo ciclo biológico. No Brasil, sete espécies estão envolvidas com a etiologia da doença, distribuídas em todas as regiões geográficas e responsáveis por diferentes manifestações clínicas. Diante disso, o diagnóstico em conjunto com a identificação da espécie é de grande importância clínico-terapêutica. Este trabalho tem por objetivo avaliar a aplicabilidade da técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para identificação de espécies de *Leishmania* envolvidas com a etiologia da LTA. Foram realizados ensaios de qPCR para padronização da Temperatura de *melting* ( $T_m$ ) utilizando cepas de referência de diferentes espécies de *Leishmania*. Após o diagnóstico em amostras de sangue de animais domésticos utilizando a qPCR, as amostras positivas foram analisadas através de suas  $T_m$ , e os produtos de qPCR foram purificados e sequenciados. Dez amostras previamente caracterizadas por isoenzimas, também foram analisadas através da  $T_m$ . Ainda como teste de referência, foi padronizada uma *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) utilizando as cepas de referência e testada nas amostras. Através da padronização da  $T_m$  das espécies, foram criados dois intervalos de análise: 1 ( $T_m = 78-79,99^\circ\text{C}$ ), que compreende: *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *Leishmania* (V.) *panamensis*, *Leishmania* (V.) *lainsoni*, *Leishmania* (V.) *guyanensis* e *Leishmania* (V.) *shawi*; e 2 ( $T_m = 80-82,2^\circ\text{C}$ ), que compreende: *Leishmania* (V.) *naiffi*, *Leishmania* (L.) *amazonensis* e *Leishmania* (L.) *mexicana*. Um total de 223 amostras positivas foi analisado, destas, 58 incluídas no intervalo 1 e 165 no intervalo 2. O sequenciamento de 94 destas amostras foi correspondente à *L.* (V.) *braziliensis*, *L.* (V.) *panamensis* e *L.* (V.) *guyanensis*. A RFLP em 173 amostras identificou 167 *L.* (V.) *braziliensis*, 05 *L.* (L.) *mexicana* e 01 *L.* (V.) *panamensis*. A análise da  $T_m$  das dez amostras caracterizadas por isoenzimas demonstrou 80% de concordância ( $p = 0,6499$ ) entre o padrão-ouro (isoenzimas) e os intervalos desenvolvidos neste estudo. Os resultados do sequenciamento foram concordantes com a qPCR em 43,62% ( $n = 41$ ) das amostras. A RFLP e qPCR tiveram 27,74% ( $n = 48$ ) de concordância. Análise estatística mostrou que a qPCR e sequenciamento são testes sem diferenças estatísticas significantes ( $p = 0,2566$ ). Sendo assim, é possível concluir que a  $T_m$  da qPCR pode ser utilizada como um método para direcionamento da espécie de *Leishmania* presente na amostra em análise, sendo necessário a realização de métodos clássicos de caracterização, quando a precisão na identificação do parasito for crucial para implementação do tratamento, como em casos de resistência e/ou recidiva da doença. A utilização desta tecnologia pode ser ainda mais precisa quando for utilizada a metodologia com sondas desenhadas para cada espécie de *Leishmania*, sendo necessários estudos futuros para comprovar esta perspectiva.

**Palavras-chave:** Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real - métodos; Leishmaniose cutânea - diagnóstico; *Leishmania*.

MORAIS, Rayana Carla Silva de. **Aplicability of real time PCR technique for leishmania species characterization da técnica de PCR em tempo real para caracterização de espécies de *Leishmania***. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

### ABSTRACT

The American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is caused by protozoa of the genus *Leishmania*, involved in a complex biological cycle. In Brazil, seven species are involved in the etiology of the disease, distributed in all geographic regions and responsible for different clinical manifestations. Therefore, the diagnosis together with the identification of the species is of great clinical and therapeutic importance. This work aims to evaluate the applicability of the technique of real-time quantitative PCR (qPCR) for the identification of *Leishmania* species involved in the etiology of ACL. qPCR assays for standardizing the melting temperature ( $T_m$ ) using reference strains of different species of *Leishmania* were performed. After the diagnosis on blood samples of domestic animals using the qPCR positive samples were analyzed by their  $T_m$  and qPCR products were purified and sequenced. Ten samples previously characterized by isoenzymes were also analyzed by  $T_m$ . Also as a reference test was standardized as Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) using the reference strains and tested on samples. Through standardization of  $T_m$  species two ranges of analysis were created: 1 ( $T_m = 78-79,99^\circ\text{C}$ ), comprising: *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *Leishmania* (V.) *panamensis*, *Leishmania* (V.) *lainsoni*, *Leishmania* (V.) *guyanensis* e *Leishmania* (V.) *shawi*; and, 2 ( $T_m = 80-82,2^\circ\text{C}$ ), comprising: *Leishmania* (V.) *naiffi*, *Leishmania* (L.) *amazonensis* e *Leishmania* (L.) *mexicana*. A total of 223 positive samples were analyzed, of these, 58 included in the range 1 and 165 in the range 2 to 94 and the sequence of these samples corresponded to *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* and *L. (V.) guyanensis*. By RFLP in 173 samples were identified 167 *L. (V.) braziliensis*, 05 *L. (L.) mexicana* and 01 *L. (V.) panamensis*. The analysis of  $T_m$  of the ten samples characterized by isoenzymes showed 80% agreement ( $p = 0.6499$ ) between the gold standard (isoenzymes) and intervals developed in this study. The sequencing results were concordant with qPCR in 43.62% ( $n = 41$ ) of the samples. The RFLP and qPCR had 27.74% ( $n = 48$ ) agreement. Statistical analysis showed that qPCR and sequencing tests are no statistically significant differences ( $p = 0.2566$ ). Thus, we conclude that the  $T_m$  of qPCR can be used as a method for direction of *Leishmania* species present in the sample under analysis, performing classic methods of characterization is necessary when the accuracy in identifying the parasite is crucial for implementation treatment, such as in cases of resistance and / or recurrence of the disease. The use of this technology can be even more precise when the methodology with probes designed for every *Leishmania* species is used; future studies are needed to confirm this view.

**Key-words:** Real Time Polymerase Chain Reaction in - methods; Cutaneous leishmaniasis - diagnosis; *Leishmania*.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 -** Incidência mundial da leishmaniose tegumentar para o ano de 2012. 16
- Figura 2 -** Distribuição das espécies de *Leishmania* responsáveis pela etiologia da leishmaniose tegumentar Americana no Brasil. 20
- Figura 3 -** Ciclo biológico da *Leishmania* spp. 21
- Quadro 1 -** Isolados de *Leishmania* spp. aplicados em ensaios de PCR em tempo real para padronização da Curva de *melting* para caracterização das espécies envolvidas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana. 33
- Figura 4 -** Fluxograma do processamento das amostras destinadas ao Serviço de Referência em Leishmanioses da FIOCRUZ-PE para determinação do diagnóstico, inclusas para avaliação da aplicabilidade da técnica de PCR quantitativa em tempo real para caracterização de *Leishmania* spp. 35
- Figura 5 -** Curva de dissociação da PCR em tempo real para DNA de cepas de referência de *Leishmania (Viannia) braziliensis* ( $T_m = 79,69^\circ\text{C}$ ), *L. (V.) naiffi* ( $T_m = 80,88^\circ\text{C}$ ) e o controle negativo (sem amplificação). 40
- Figura 6 -** *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) utilizando os produtos da qPCR-kDNA1 obtidos de oito cepas de referência para *Leishmania* spp. 43
- Figura 7 -** Fluxograma do processamento das amostras e o N utilizado por técnica. 44

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Classificação das amostras positivas para Leishmaniose Tegumentar Americana conforme intervalo estabelecido para a média da temperatura de *melting* de ensaios de PCR em tempo real em cepas de *Leishmania* spp. de referência. 41
- Tabela 2 -** Classificação das amostras previamente caracterizadas por *Multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) em relação ao intervalo de análise para a temperatura de *melting* dos ensaios de PCR em tempo real, desenvolvidos neste estudo. 42
- Tabela 3 -** Análise comparativa e concordância entre as técnicas de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) e *Multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE). 44
- Tabela 4 -** Análise comparativa e concordância entre as técnicas de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). 45
- Tabela 5 -** Análise comparativa e concordância entre as técnicas de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) e sequenciamento. 45

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

<b>BLASTn</b> -	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta de Pesquisa Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia)
<b>CPqAM</b> -	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
<b>Ct</b> -	<i>Ciclo Threshold</i> (Ciclo limiar)
<b>DNA</b> -	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico)
<b>dNTP</b> -	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i> (Deoxinucleotídeo trifosfato)
<b>FIOCRUZ</b> -	Fundação Oswaldo Cruz
<b>IDRM</b> -	Intradermorreação de Montenegro
<b>IOC</b> -	Instituto Oswaldo Cruz
<b>ITS1</b> -	<i>Internal Transcribed Spacer 1</i> (Espaçador Interno Transcrito)
<b>kDNA</b> -	Kinetoplast DNA (DNA do cinetoplasto)
<b>LC</b> -	Leishmaniose Cutânea
<b>LCDf</b> -	Leishmaniose Cutânea Difusa
<b>LCDs</b> -	Leishmaniose Cutânea Disseminada
<b>LMC</b> -	Leishmaniose Mucocutânea
<b>LT</b> -	Leishmaniose Tegumentar
<b>LTA</b> -	Leishmaniose Tegumentar Americana
<b>LV</b> -	Leishmaniose Visceral
<b>MgCl<sub>2</sub></b> -	<i>Magnesium Chloride</i> (Cloreto de magnésio)
<b>MLEE</b> -	<i>Multilocus enzyme electrophoresis</i> (Eletroforese de Enzima Multilocus)
<b>OMS</b> -	Organização Mundial da Saúde
<b>PCR</b> -	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
<b>PE</b> -	Pernambuco
<b>qPCR</b> -	<i>Quantitative real time PCR</i> (PCR quantitativa em tempo real)
<b>RFLP</b> -	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo de Tamanho do Fragmento de Restrição)
<b>RIFI</b> -	Reação de Imunofluorescência Indireta
<b>RJ</b> -	Rio de Janeiro
<b>RRL</b> -	Rede de Referência em Leishmanioses
<b>SNRL</b> -	Serviço Nacional de Referência em Leishmanioses
<b>SRL</b> -	Serviço de Referência em Leishmanioses

- SSurDNA** - Small-Subunit Ribosomal DNA (DNA da Subunidade Menor do Ribossomo)
- TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- T<sub>m</sub>** - *Melting Temperature* (Temperatura de fusão)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL</b>	16
<b>2.1 Distribuição geográfica</b>	16
<b>2.2 Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar</b>	17
<b>2.3 Etiologia e epidemiologia da leishmaniose tegumentar</b>	19
2.3.1 <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (FLOCH, 1954)	21
2.3.2 <i>Leishmania (Viannia) naiffi</i> (LAINSON; SHAW, 1989)	22
2.3.3 <i>Leishmania (Viannia) shawi</i> (LAINSON et al., 1989)	22
2.3.4 <i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i> (SILVEIRA et al., 1987)	22
2.3.5 <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (LAINSON; SHAW, 1972)	23
2.3.6 <i>Leishmania (Viannia) lindenbergi</i> (SILVEIRA et al., 2002)	23
2.3.7 <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> (MATTA, 1916; VIANNA, 1911)	23
<b>2.4 Diagnóstico da leishmaniose tegumentar Americana</b>	24
<b>2.5 Caracterização de espécies de <i>Leishmania</i></b>	26
2.5.1 Anticorpos monoclonais	26
2.5.2 <i>Multilocus enzyme electrophoresis</i> (MLEE)	26
2.5.3 <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP)	27
2.5.4 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	27
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	30
<b>4 OBJETIVO GERAL</b>	32
<b>4.1 Objetivos específicos</b>	32
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b>	33
<b>5.1 Amostragem</b>	33
5.1.1 Cepas de Referências	33
5.1.2 Amostras de Campo	33
5.1.3 Amostras previamente caracterizadas	34
<b>5.2 Processamento das amostras</b>	34
5.2.1 Extração de DNA	34
5.2.2 Padronização da <i>T<sub>m</sub></i> por espécie de <i>Leishmania</i>	34
5.2.3 Diagnóstico da LTA	35
5.2.4 Classificação das amostras por meio da <i>T<sub>m</sub></i>	36

5.2.5 <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP)	36
5.2.6 Sequenciamento dos produtos	36
<b>5.3 Análise dos dados</b>	37
<b>6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b>	38
<b>7 RESULTADOS</b>	39
<b>7.1 Padronização da <math>T_m</math> para diferenciação de espécies de <i>Leishmania</i></b>	39
<b>7.2 Diagnóstico da LTA em amostras de campo</b>	41
7.2.1 Classificação das amostras por meio da $T_m$	41
7.2.2 qPCR-kDNA e RFLP	42
7.2.3 Sequenciamento	43
<b>7.3 Análise comparativa</b>	43
7.3.1 qPCR e MLEE	44
7.3.2 qPCR e RFLP	45
7.3.3 qPCR e sequenciamento	45
<b>8 DISCUSSÃO</b>	46
<b>9 CONCLUSÃO</b>	49
<b>10 PERSPECTIVAS</b>	50
<b>REFERÊNCIAS</b>	51
<b>APÊNDICE A - TCLE</b>	58
<b>ANEXO A - Certificado da licença na CEUA</b>	59
<b>ANEXO B - Termo aditivo da licença na CEUA</b>	60
<b>ANEXO C - Parecer de Aprovação no CEP</b>	61

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um complexo de doenças zoonóticas parasitárias causadas por um grupo heterogêneo de protozoários (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) do gênero *Leishmania*, que têm um ciclo de vida heteroxênico, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, sendo estes últimos, conhecidos como flebotomíneos, responsáveis pela transmissão dos parasitos entre seus hospedeiros-reservatórios através do repasto sanguíneo de fêmeas infectadas pelas formas promastigotas do parasito.

A doença apresenta duas principais formas clínicas: visceral e tegumentar. Tendo a Leishmaniose Visceral (LV) como a forma de maior gravidade, em decorrência do parasitismo generalizado do sistema linfático, causando complicações sistêmicas, e sintomas como hepatoesplenomegalia, febre irregular e prolongada, anemia e perda de peso, podendo ocasionar a morte do indivíduo se não for tratada. A Leishmaniose Tegumentar (LT) frequentemente apresenta lesões cutâneas expansivas e persistentes, raramente múltiplas, com tendência a produzir metástases na mucosa nasal em cerca de 4% a 5% dos casos, no entanto, o tipo da lesão, eficiência do tratamento, tempo de cicatrização, entre outros fatores, variam de acordo com a etiologia.

São conhecidas mais de 30 espécies de *Leishmania*, sendo mais de 20 patogênicas ao homem. A maior parte das leishmanioses é zoonótica, no entanto, a forma antroponótica tem ocorrido de maneira significativa em países do velho mundo (causada por *Leishmania (L.) tropica*). De acordo com a espécie parasitária envolvida, as formas tegumentar e visceral, diferem em distribuição geográfica, hospedeiro/vetor e taxas de incidência e de mortalidade; sendo importante ressaltar que, dependendo do hospedeiro vertebrado envolvido, uma única espécie pode causar diferentes formas da doença.

Neste contexto, a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida com a LT é de fundamental importância clínica e terapêutica para melhor direcionamento do tratamento e prognósticos quanto a evolução clínica e epidemiológica, com informações sobre que possíveis reservatórios e vetores que estão presentes na área de estudo. A identificação de maneira menos laboriosa que os métodos tradicionalmente utilizados, já tem sido preocupação de muitas pesquisas.

Como resultado do empenho da comunidade científica, diversas técnicas vêm apresentando destaque, como por exemplo: *Multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) e caracterização por anticorpos monoclonais. Tais metodologias são válidas, no entanto, são laboriosas, necessitando de, no

mínimo, três etapas para obtenção do resultado final. Deste modo, pesquisadores do Velho e do Novo Mundo têm avaliado a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para este fim.

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar a aplicabilidade da técnica de qPCR para caracterização de *Leishmania* spp. envolvidas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana no Brasil, visando proporcionar um diagnóstico ainda mais preciso, rápido e acessível à rede Nacional de Referência para o diagnóstico das leishmanioses.



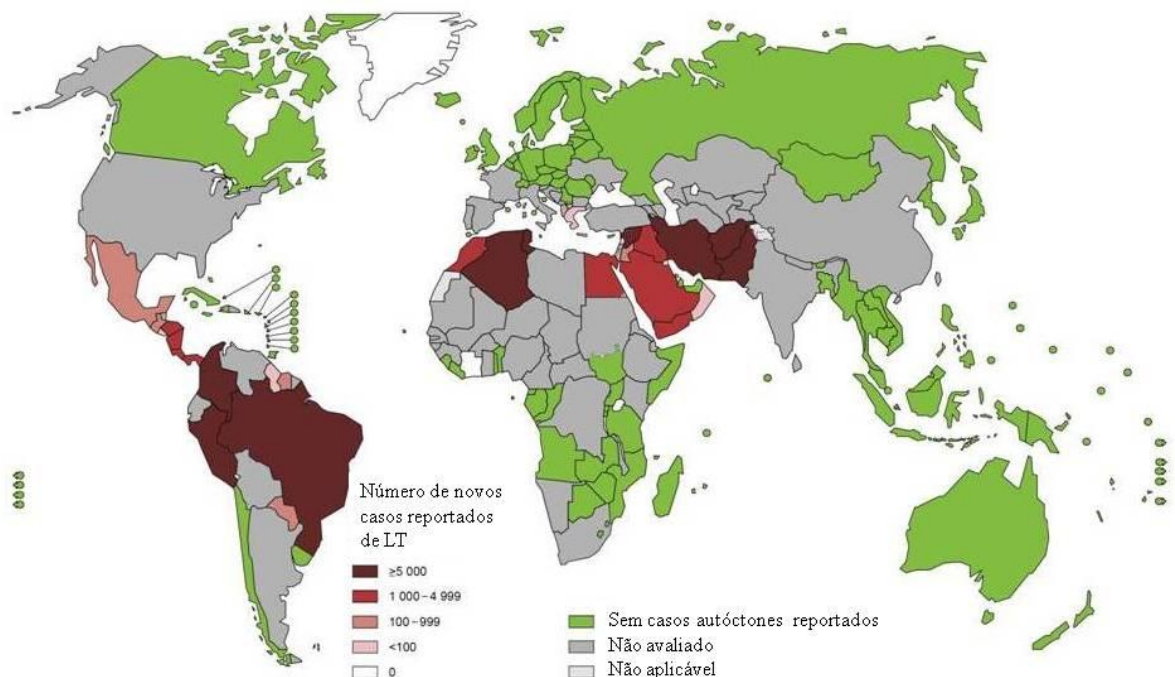
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

### 2.1 Distribuição geográfica

Atualmente as leishmanioses ocorrem em 98 países distribuídos em cinco dos seis continentes e sua notificação é compulsória em apenas 30 deles (ALVAR et al., 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a doença, com registro aproximado de dois milhões de novos casos, das diferentes formas clínicas ao ano (ALVAR et al., 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014).

A LT é a forma mais disseminada da doença (Figura 1). Foram registrados oficialmente mais de 200.000 casos por ano no mundo, deste total, 70-75% dos casos ocorrem em dez países: Afeganistão, Algéria, Colômbia, Brasil, Iran, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru. Diante desta situação a OMS estima que ocorra uma incidência anual de 0,7 a 1,2 milhões de casos (ALVAR et al., 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014).

**Figura 1** - Incidência mundial da leishmaniose tegumentar para o ano de 2012.



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2013, tradução nossa).

No continente Americano a doença é nomeada de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e neste, são apresentados mais de 66.000 casos, (ALVAR et al., 2012)

distribuídos desde o meridional dos Estados Unidos até o setentrional da Argentina, exceto o Uruguai e Chile (SKRABA et al., 2014). Os principais países responsáveis pelos casos registrados na América Latina são: Brasil (26.008 casos/ano), Colômbia (17.420 casos/ano), Peru (6.405 casos/ano), Bolívia (2.647 casos/ano) e Argentina (261 casos/ano) (ALVAR et al., 2012).

No Brasil, na década de 80, a LTA foi registrada em 19 Unidades Federativas, quando em 2003, foi confirmada a autoctonia em todos os estados brasileiros (BRASIL, 2010). No período de 2003 a 2012 foram registrados mais de 250.000 casos, sendo 103.397 na Região Norte, 78.188 na Nordeste, 39.173 na Centro-Oeste, 24.306 na Sudeste e 5.639 na Sul. A região Nordeste comporta pouco mais de 30% dos casos do país, tendo como principais responsáveis os estados do Maranhão, Ceará, Bahia e Pernambuco (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2014).

No estado de Pernambuco, a LTA apresenta alta prevalência estando relacionada à floresta Atlântica Tropical remanescente, ocorrendo em todas as regiões do estado, com predominância (mais de 60% dos casos) na Zona da Mata Atlântica, sendo quase totalmente na forma cutânea localizada (BRANDÃO-FILHO et al., 1999; BRITO et al., 2009), com uma média de 517 casos/ano (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2014).

## **2.2 Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar**

A LT está entre as seis doenças infecciosas de maior importância no mundo, esta afecção dermatológica necessita de muita atenção, devido à sua alta potencialidade em causar deformidades, comprometendo assim a vida psicossocial e econômica do indivíduo afetado, podendo ser considerada uma doença ocupacional (BRASIL, 2010; SKRABA et al., 2014).

A lesão inicial ocorre após a picada do flebotomíneo contaminado pelas formas promastigotas do parasito. Forma-se uma mácula, que a partir de duas semanas pode apresentar um nódulo e/ou pápula eritematosa pequena e pruriginosa (GOTO; LINDOSO, 2012). A apresentação das lesões formadas dependerá da espécie do agente etiológico envolvido (DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2012; LEISHMANIASIS..., 2014), além da imunidade do hospedeiro, podendo ser: úlcera, nódulos e lisas, placas planas ou verrugosas com hiperqueratose; estas lesões podem permanecer localizadas e evoluírem para cura espontânea, ou através dos vasos linfáticos, se disseminarem e produzir lesões secundárias em outras regiões da pele e mucosas (LEISHMANIASIS..., 2014). Estas lesões

podem ser agravadas por infecções bacterianas secundárias, envolvimento linfático, recorrência local, comprometimento de mucosas, além do risco de linfonodopatia não ser descartado (BALEY, 2013; DAVID; CRAFT, 2009; LEISHMANIASIS..., 2014). Diante da diversidade de características clínicas, a LT é dividida em: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL); Leishmaniose Cutânea Difusa (LCDf); Leishmaniose Cutânea Disseminada (LCDs); Leishmaniose Mucocutânea (LMC).

LCL é o tipo mais comum e menos severo da doença, formada por lesões localizadas indolores, singulares, ulcerativas ou nodulares de formato ovalado ou arredondado com bordas bem delimitadas, medindo de milímetros até centímetros, presentes em partes do corpo expostas à picada do flebotomíneo (como pernas, braços e rosto), produzindo lesões múltiplas ou não (BRASIL, 2010; MCGWIRE; SATOSKAR, 2013; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014). A lesão cutânea localizada é a primeira a apresentar-se na maioria dos casos, podendo progredir para outras formas dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida (LINDOSO et al., 2012). Nesta forma clínica, é habitual a cura espontânea, contudo, recidivas são frequentes (BRASIL, 2010; MCGWIRE; SATOSKAR, 2013; OLIVEIRA-NETO et al., 1998).

LCDf produz lesões cutâneas disseminadas e crônicas que se assemelham à hanseníase (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014). Apesar de rara, esta forma é grave, ocorrendo em consequência da resistência ao tratamento, associada à inativação funcional e deficiência na resposta imune celular frente a antígenos de *Leishmania*; produzindo lesões nodulares por larga extensão cutânea (BRASIL, 2010).

LCDs, confundida frequentemente com a forma LCDf, tem expressão rara (até 2% dos casos), com apresentação de múltiplas lesões papulares (parecidas com acnes) acometendo uma grande extensão corporal devido a quantidade de lesões que podem chegar a centenas (BRASIL, 2010).

LMC acomete parcialmente ou totalmente mucosas do nariz, boca e garganta sem cura espontânea, acredita-se que essa contaminação seja hematogênica (AMATO et al., 1998; 2008; BRASIL, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014). De maneira amena esta doença ocorre em aproximadamente 5% dos casos de LTA, embora no Brasil, a incidência tenha aumentado nos últimos anos (AMATO et al., 2008; BRASIL, 2010).

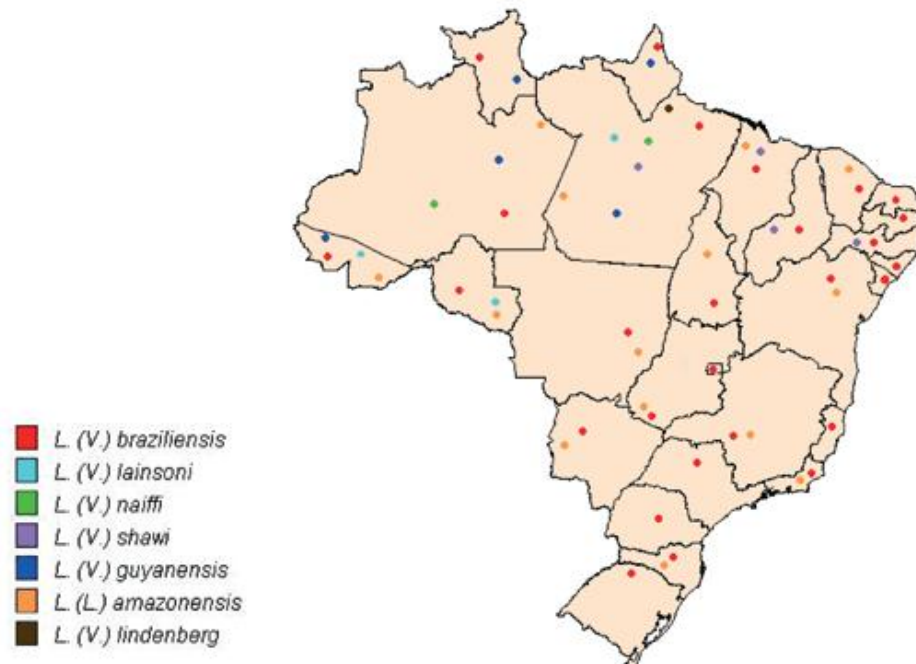
### 2.3 Etiologia e epidemiologia da leishmaniose tegumentar

No Velho Mundo as espécies que causam a LT são as do complexo *Leishmania tropica*; (*L. (Leishmania) tropica*, *Leishmania (Leishmania) major* e *Leishmania (Leishmania) aethiopica*), a maioria das espécies é zoonótica, exceto *L. (L.) tropica*, que é antroponótica. Algumas cepas de *Leishmania (Leishmania) infantum* podem ser responsáveis por causar LT sem comprometimento dos órgãos internos nesta região do mundo (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVÁ, 2012; LEISHMANIASIS..., 2014; MASMOUDÍ et al., 2013;).

No Novo Mundo, encontram-se as espécies do complexo *Leishmania braziliensis*; *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) shawi* e *L. (Viannia) peruviana* e, do complexo *L. mexicana*; *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Leishmania) venezuelensis*, além de *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) naiffi* e *L. (Viannia) lindenbergi*; sendo todas as espécies zoonóticas (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVÁ, 2012; LEISHMANIASIS..., 2014). A maioria das espécies tanto do Velho Mundo como do Novo Mundo causam apenas lesões na pele, porém *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis* podem causar lesões também em mucosas (forma mucocutânea) (LEISHMANIASIS..., 2014).

No continente Americano, são conhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* envolvidas com a etiologia da LTA em casos humanos, entretanto, no Brasil foram identificadas apenas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. A maior diversidade etiológica ocorre nas regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2010). A figura 2 demonstra a distribuição de *Leishmania* spp. no Brasil, caracterizando a complexidade etiológica da LTA.

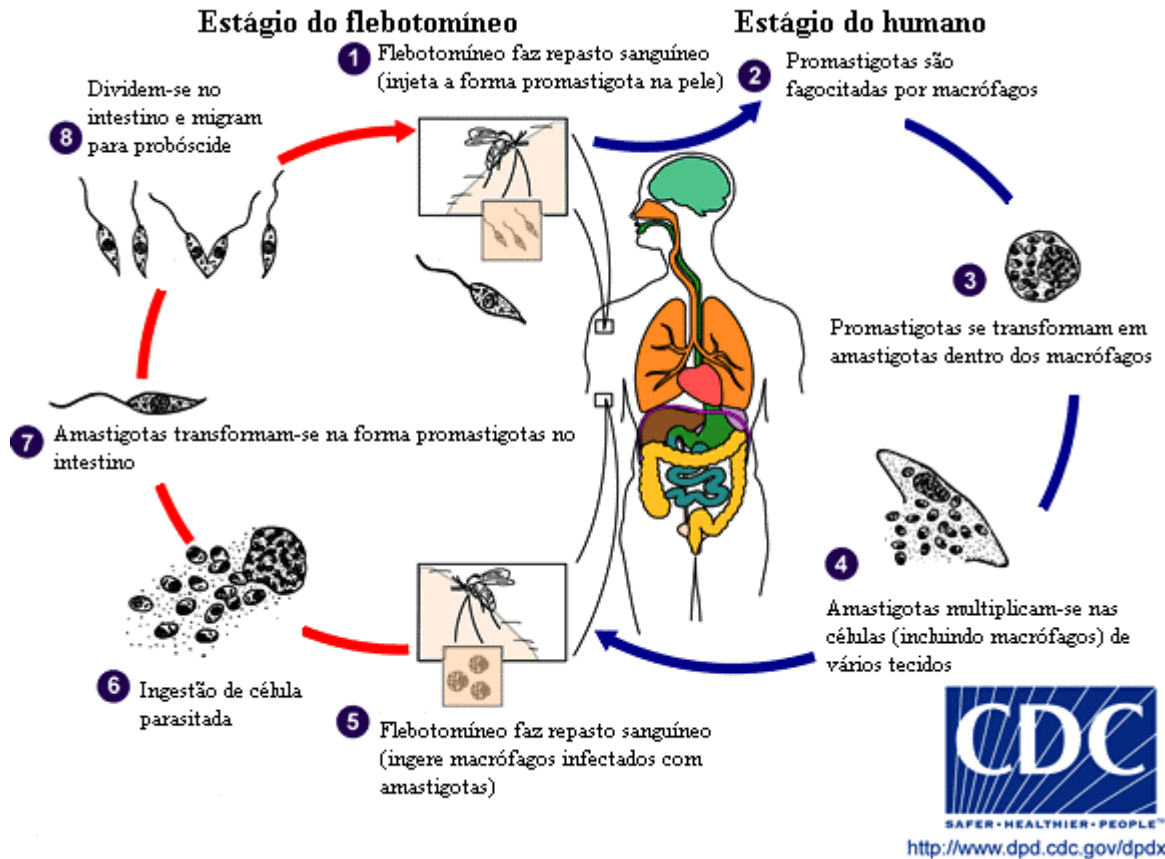
**Figura 2** - Distribuição das espécies de *Leishmania* responsáveis pela etiologia da leishmaniose tegumentar Americana no Brasil.



Fonte: Brasil (2010).

O ciclo de vida de *Leishmania* spp. é digenético, acontecendo uma parte em hospedeiro invertebrado e outra em hospedeiro vertebrado. O hospedeiro invertebrado, flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo), infecta-se com as formas amastigotas ao picar um indivíduo ou animal parasitado. No tudo digestivo do inseto as amastigotas modificam-se para a forma flagelada, promastigotas, as quais se multiplicam por divisão binária. Essa diferenciação ocorre mais especificamente no intestino posterior para as espécies pertencentes ao subgênero *Viannia*, e intestino anterior para as do subgênero *Leishmania*. Em grande quantidade, as formas promastigotas chegam ao proventrículo do inseto. Na necessidade de alimentar-se, o flebotomíneo faz novo repasto sanguíneo, injetando assim, as formas infectivas. No homem ou animal, as promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos, e retornam a forma amastigota intracelular, que multiplicam-se por divisão binária simples de tal modo a romper a célula hospedeira. Ao sair da célula os parasitos modificam-se novamente para as formas promastigotas, que são fagocitados pelos macrófagos. Quando o inseto vetor se alimenta deste indivíduo infectado reinicia o ciclo (Figura 3) (REY, 2001).

Figura 3 - Ciclo biológico da *Leishmania* spp.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2014, tradução nossa).

Diante do complexo ciclo epidemiológico da LTA, serão apresentadas a seguir as principais características das espécies envolvidas com a etiologia da doença no Brasil.

### 2.3.1 *Leishmania (Viannia) guyanensis* (FLOCH, 1954)

*L. (V.) guyanensis*, espécie, até então, limitada à Região Norte (Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) estendendo-se para Guiana (extremo Norte da América do Sul). É encontrada em áreas da floresta que não alagam em períodos chuvosos. Seus possíveis reservatórios são a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) e o gambá (*Didelphis albiventris*), que ocorrem na margem do rio Amazonas (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003). A espécie causa lesões cutâneas ulceradas únicas ou múltiplas (a depender da quantidade de picadas recebidas do flebotomíneo ou metástases linfáticas secundárias) (BRASIL, 2010), sendo responsável por manifestações clínicas referente à LCL e LMC (LAINSON; SHAW, 2005). Esta espécie é transmitida por *Lutzomyia*

*umbratilis*, *Lutzomyia anduzei* e *Lutzomyia whitmani* (GONTIJO; CARVALHO, 2003; RANGEL; LAINSON, 2009).

### 2.3.2 *Leishmania (Viannia) naiffi* (LAINSON; SHAW, 1989)

*L. (V.) naiffi*, ocorre nos estados do Pará e Amazonas, o parasito foi isolado e caracterizado em tatu (*Dasytus novemcinctus*), deste modo, provavelmente a espécie apresentará uma distribuição geográfica muito mais ampla se acompanhar a deste hospedeiro (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003). A espécie é transmitida por *Lutzomyia squamiventris*, *Lutzomyia paraensis* e *Lutzomyia ayrozai* (BRASIL, 2010; RANGEL; LAINSON, 2009). Esta sendo responsável pela forma cutânea localizada (LCL) (LAINSON; SHAW, 2005).

### 2.3.3 *Leishmania (Viannia) shawi* (LAINSON et al., 1989)

*L. (V.) shawi*, também responsável pela forma cutânea localizada (LCL) (LAINSON; SHAW, 2005), ocorre nos estados do Pará e Maranhão, porém Brito et al. (2009) caracterizaram esta espécie no estado de Pernambuco. O parasito já foi isolado de alguns mamíferos silvestres, tais como: macacos (*Chiropotes satanas* e *Cebus apella*), quati (*Nasua nasua*) e preguiça (*Choloepus didactylus*), apesar do hábito arbóreo destes animais, a transmissão ocorre em nível de solo. O único vetor comprovado desta espécie é o *Lu. whitmani* (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

### 2.3.4 *Leishmania (Viannia) lainsoni* (SILVEIRA et al., 1987)

*L. (V.) lainsoni* ocorre na região Norte (Pará, Roraima e Acre), sendo isolado e caracterizado da paca (*Agouti paca*), seu possível reservatório. Transmitido por *Lutzomyia ubiquitalis*, considerado um flebotomíneo de baixa antropofilia, explicando assim o reduzido número de casos (BRASIL, 2010; RANGEL; LAINSON, 2009). Esta espécie é responsável pela subforma LCL (LAINSON; SHAW, 2005).

### 2.3.5 *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LAINSON; SHAW, 1972)

*L. (L.) amazonensis*, incriminada por causar lesões correspondentes a LCDf levando até a lesões mucosas (LAINSON; SHAW, 2005). Ocorre em todas as regiões do país: Norte (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins), Nordeste (Maranhão, Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) e Sul (Paraná). O parasito foi isolado de roedores silvestres dos gêneros *Proechymis* e *Oryzomys* e, evidências indicam que estes são reservatórios do parasito, apesar do papel desses animais no ciclo desta espécie ainda não está bem esclarecido. A transmissão ocorre por *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia nociva*, sendo estas, pouco antropofílicas (BRASIL, 2010).

### 2.3.6 *Leishmania (Viannia) lindenbergi* (SILVEIRA et al., 2002)

*L. (V.) lindenbergi* foi isolada de militares em treinamento em área de reserva florestal no Pará. No entanto, seus hospedeiros-reservatórios e flebotomíneos vetores ainda são desconhecidos, tendo a *Lutzomyia antunesi* como provável espécie vetora (BRASIL, 2010; RANGEL; LAINSON, 2009). Esta espécie é responsável pela subforma LCL (LAINSON; SHAW, 2005).

### 2.3.7 *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MATTA, 1916; VIANNA, 1911)

*L. (V.) braziliensis* é a primeira e principal espécie envolvida com a etiologia da LTA não apenas no Brasil, mas em toda América Latina, com ampla distribuição desde a América Central até o Norte da Argentina. No Brasil é encontrada em todas as zonas endêmicas do país, transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos tais como, *Lu. whitmani*, *Lutzomyia complexa*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia wellcomei*, *Lutzomyia migoniei* e *Lutzomyia neivai* (BRASIL, 2010; BRITO et al., 2012; GONTIJO; CARVALHO, 2003; LACERDA, 1994). Em geral, a transmissão de *L. (V.) braziliensis*, principal espécie identificada em Pernambuco, vincula-se à atividades profissionais tais como cultivo de cana de açúcar, cacau e banana (MARINHO-JÚNIOR, 2010). O parasito já foi isolado de diferentes roedores sinantrópicos (*Rattus rattus*) e silvestres (*Bolomys lasiurus*, *Nectomys squamipes*), felídeos (*Felis catus*), canídeos (*Canis Lupus familiaris*) e eqüídeos (*Equus caballus* e *Equus asinus*). Em relação aos animais domésticos, não está bem esclarecido o papel desses animais no ciclo



dessa espécie (BRASIL, 2010). Esta espécie é responsável pela subformas LCL e LMC (LAINSON; SHAW, 2005).

#### **2.4 Diagnóstico da leishmaniose tegumentar Americana**

O diagnóstico da LTA pode ser realizado através de aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (SKRABA et al., 2014). O diagnóstico clínico pode ser realizado com base nas características da lesão associadas à anamnese, onde os dados epidemiológicos são de grande importância. Porém, o amplo espectro de lesões dificulta esta forma de diagnóstico, tornando-o nem sempre simples ou imediato, e ainda se fazendo necessário o diagnóstico diferencial, uma vez que as úlceras dérmicas formadas pela LTA podem se confundir com enfermidades como: hanseníase, sífilis e tuberculose cutânea (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MASMOUDÍ et al., 2013).

As técnicas clássicas incluem exame parasitológico direto, intradermorreação de Montenegro, isolamento do parasito em meio de cultura e detecção de anticorpos anti-*Leishmania* por métodos sorológicos (BART et al., 2013; BRITO et al., 2000; WEIGLE et al., 1987). O exame mais simples e de baixo custo é a pesquisa direta de formas amastigotas visualizadas ao microscópio óptico. A sensibilidade deste teste é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão, sendo raros os parasitos após um ano de evolução da doença (CUBA CUBA et al., 1985). A especificidade é de 100% e sensibilidade variando entre 64-80%, a depender da qualidade técnica (MASMOUDÍ et al., 2013). Além do exame direto, a tentativa do isolamento *in vivo* ou *in vitro* é fundamental, inoculando-se o material obtido de lesões em meio de cultura e em animais susceptíveis como o hamster (*Mesocricetus auratus*) (BRASIL, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003). O isolamento através de meio de cultura, embora 100% específico, apresenta uma baixa sensibilidade (MASMOUDÍ et al., 2013).

A Intradermorreação de Montenegro (IDRM) avalia a resposta de hipersensibilidade celular retardada (BASANO; CAMARGO, 2004; MARZOCHI, 1992; SKRABA et al., 2014) sendo de grande valor presuntivo no diagnóstico de LTA, constituindo valioso recurso nos casos em que os parasitos estão escassos ou ausentes. É bastante útil nos inquéritos epidemiológicos de prevalência em áreas endêmicas (BRASIL, 2010; KAR, 1995; SHAW; LAINSON, 1975), porém, o teste é positivo durante a doença e após a cura, não diferenciando doença atual de regressa, além de habitualmente ser negativo na forma difusa, e apresentar baixa especificidade (BRASIL, 2010).

Dentre os métodos sorológicos, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é o teste mais utilizado. É uma técnica sensível, porém apresenta reações cruzadas com outras doenças parasitárias, tais como doença de Chagas e leishmaniose visceral, além da esquistossomose (BRITO et al., 2000; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Na tentativa de superar as limitações apresentadas pelas técnicas clássicas, há cerca de dez anos, os métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos para identificação de grupos e espécies de *Leishmania* em variadas amostras clínicas, isolados de cultura, bem como *pool* de flebotomíneos (MICHALSKY et al., 2002), havendo destaque para a tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*). A alta sensibilidade e especificidade, a habilidade de detectar e identificar o protozoário envolvido, e o fato de poder ser aplicada diretamente em amostras clínicas, produzindo um resultado confiável dentro de poucas horas, são vantagens indiscutíveis da PCR em relação aos métodos de diagnóstico tradicionais (BEN ABDA et al., 2011; IKONOMOPOULOS et al., 2003; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013).

Nos últimos anos, a PCR apresentou um significativo avanço em sua tecnologia; é a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), capaz de promover a quantificação acurada e o monitoramento, em tempo real, do produto amplificado. Esta técnica vem sendo utilizada por diversos autores, em amostras provenientes de animais e pacientes humanos, possibilitando a realização de estudos relacionados à carga parasitária, interação hospedeiro-parasito e monitoramento da terapia (BEN ABDA et al., 2011; FRANCINO et al., 2006; MARY et al., 2004; MORTARINO et al., 2004; NICOLAS et al., 2002; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013; ROLÃO et al., 2004; ROURA; SANCHEZ; FERRER, 1999; VITALE et al., 2004; WORTMANN et al., 2004).

Os resultados da qPCR são baseados em gráficos gerados no computador durante a reação (PAIVA-CAVALCANTI, 2008). A análise dos resultados é feita através de quatro parâmetros:

- a) **Curva de amplificação** - nos informa o *Ciclo threshold (Ct)* das amostras em análise, inclusive a curva padrão;
- b) **Espectro** - mostra a captação da fluorescência por filtros previamente determinados, a depender do corante fluorescente utilizado no ensaio;
- c) **Componente** - mostra o comportamento da emissão de fluorescência por cada corante ou fluorocromo usado durante a reação. Sendo a referência passiva do aparelho o parâmetro que deve manter-se constante;

- d) **Curva de dissociação** - onde é possível observar a emissão de fluorescência pela temperatura de fusão ou *melting temperature* ( $T_m$ ). A  $T_m$  é a temperatura onde 50% dos produtos amplificados encontram-se dissociados, na forma de fita simples, causando uma queda brusca da intensidade de fluorescência pela liberação do corante SYBR Green (BROWN, 2003). Nesta análise podem ser verificadas amplificações inespecíficas e dímeros de *primer*, uma vez que cada alvo deve ter sua  $T_m$  específica. Através desta propriedade da qPCR em alterar a  $T_m$  para diferentes produtos amplificados, diversos autores têm utilizado a metodologia para diferenciação de espécies de *Leishmania* (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013; PITA-PEREIRA et al., 2012; TOZ et al., 2013; WEIRANTHER et al., 2011).

## 2.5 Caracterização de espécies de *Leishmania*

Diante da importância da identificação de espécies de *Leishmania* relacionadas com a etiologia da LT, diversas pesquisas têm sido direcionadas para este fim, utilizando diferentes tecnologias:

### 2.5.1 Anticorpos monoclonais

Realizada através da técnica Imunofluorescência indireta utilizando um painel de anticorpos monoclonais espécie, gênero e/ou subgênero específico para diferenciar as espécies de *Leishmania* em isolados de pacientes, roedores e flebotomíneos (BRITO et al., 2009, 2012; CUBA-CUBA et al., 1996; ZAULI et al., 2012). O principal ponto de dificuldade desta técnica é a necessidade de isolamento do parasito, o que a torna inviável de ser realizada em amostras de campo.

### 2.5.2 *Multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE)

Esta técnica tem por objetivo submeter às cepas de *Leishmania* obtidas de isolados de tecidos do hospedeiro, à atividade de um conjunto de enzimas, seguida por eletroforese em gel de agarose para visualização do bandejamento (BRITO et al., 2009; 2012; CUPOLILLO et al., 1994, 1995; SANTIS et al., 2011). Apesar de tratar-se de uma técnica sensível, considerada um dos padrões-ouro de caracterização de espécies, é bastante laboriosa por necessitar do isolamento e cultivo, e análise de múltiplos perfis enzimáticos (BEN ABDA et al., 2011).

### 2.5.3 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Diversos autores têm utilizado a RFLP para diferenciação de espécies de *Leishmania* (AZMI et al., 2011; BENSOUSSAN et al., 2006; EL-BESHBISHY; AL-ALI; EL-BADRY, 2013; EL-TAI et al., 2000; HAJJARAN et al., 2011; SCHONIAN et al., 2003; YEHIA et al., 2012). Nesta técnica, os produtos da PCR das amostras são submetidos à digestão enzimática, e analisados através de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, sendo necessária comparação com um padrão formado previamente.

Para fins de RFLP, é indispensável à escolha de um sistema de PCR, capaz de diferenciar cada espécie. Diante disto, os autores têm escolhido sistemas baseados no DNA ribossomal (rDNA), mais especificamente, o Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) (AZMI et al., 2011; BENSOUSSAN et al., 2006; EL-BESHBISHY; AL-ALI; EL-BADRY, 2013; EL TAI et al., 2000; HAJJARAN et al., 2011; SCHONIAN et al., 2003; YEHIA et al., 2012).

El Tai et al. (2000) desenvolveram cinco *primers* (utilizando o alvo ITS1) combinados de maneira diferente, conseguindo melhor performance com o par LITSR e L58S, que desde então, tem sido amplamente utilizado por diversos autores tanto do Velho como do Novo Mundo para fins de caracterização de espécie de *Leishmania* (AZMI et al., 2011; EL-BESHBISHY; AL-ALI; EL-BADRY, 2013; SCHONIAN et al., 2003; YEHIA et al., 2012). El-Tai et al. (2000) concluíram que é possível amplificar e estudar a região ITS, sem a necessidade de cultivo da amostra biológica, deste modo, representando um avanço significativo, uma vez que a cultura nem sempre é viável a depender das condições de coleta e manutenção do meio.

### 2.5.4 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando a técnica de qPCR para fins de diferenciação de espécies de *Leishmania* (CASTILHO et al., 2008; KHOSRAVI et al., 2012; NICOLAS; MILON; PRINA, 2002; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013; PITA-PEREIRA et al., 2012; TOZ et al., 2013; WEIRANTHER et al., 2011).

Castilho et al. (2008), no Novo Mundo, desenvolveram dois sistemas (L e V), um para o subgênero *Leishmania* e outro para o *Viannia*, baseados no gene *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase* (G6PD). Com esse estudo, conseguiram amplificação específica para o subgênero desejado em cepas de referência. Os autores obtiveram diferenças dentro do mesmo subgênero, com destaque para *L. (V.) braziliensis* ( $T_m = 80,15^\circ\text{C}$ ) e *L. (V.) peruviana*

( $T_m = 80,05^\circ\text{C}$ ), em relação às outras espécies, as quais apresentaram  $T_m$  variando de  $80,3^\circ\text{C}$  a  $81^\circ\text{C}$ . No entanto, os autores concluíram que estes resultados não podem ser usados para distinção entre as espécies, devido à variações intra-ensaios.

Khosravi et al. (2012), utilizaram a técnica de qPCR para diferenciar espécies do mesmo subgênero (*Leishmania*), responsáveis pela LT no Velho Mundo (*L. (L.) major* e *L. (L.) tropica*). Utilizaram cepas de referência das espécies e obtiveram  $T_m$  para *L. (L.) major* de  $89,5^\circ\text{C}$  e *L. (L.) tropica* de  $91,3^\circ\text{C}$ . Testando a qPCR em amostras de biópsia de lesão de pele de pacientes, os autores identificaram *Leishmania major* em 75 e *L. tropica* em quatro casos. Com esse estudo Khosravi et al. (2012) concluíram que a qPCR é um método além de sensível para o diagnóstico, capaz de identificar rapidamente espécies.

Ainda no velho mundo, Nicolas, Milon e Prina (2002) testaram dois sistemas de primers, já desenvolvidos anteriormente por Nicolas et al. (2000) (JW11/JW12 e JW13/JW14), com o objetivo de verificar diferenças através da  $T_m$  entre *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica* utilizando amostras caracterizadas de isolado de pacientes. Neste estudo, os autores não conseguiram diferenças significativas entre as espécies para o sistema JW11/JW12. No entanto, com o JW13/JW14 conseguiram diferenças significativas entre *L. (L.) major* ( $T_m = 83,86^\circ\text{C}$ ), *L. (L.) donovani* ( $T_m = 87,12^\circ\text{C}$ ), *L. (L.) tropica* ( $T_m = 88,89^\circ\text{C}$ ) e *L. (L.) infantum* ( $T_m = 89,21$  a  $89,47^\circ\text{C}$ ), porém analisando estas duas últimas individualmente, não foi verificada diferença significativa entre as  $T_m$ , apesar do teste em várias cepas de *L. (L.) infantum*.

Toz et al. (2013), testaram a qPCR (com o alvo ITS1) para diferenciar através da  $T_m$ , *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica*. Após otimização, utilizando cepas de referência, os autores consideraram as seguintes  $T_m$  para cada espécie  $68^\circ\text{C}$ ,  $58^\circ\text{C}$  e  $62^\circ\text{C}$ , respectivamente. Como padrão-ouro para as cepas foi considerado a MLEE. Para validar seus resultados, foram testadas amostras clínicas (humanos e cães), e estas também foram sequenciadas, tendo concordância entre sequenciamento e qPCR de 98,03% das amostras. Este trabalho é de grande contribuição epidemiológica, uma vez que conclui que *L. (L.) tropica* também é responsável, além da LT, pela leishmaniose visceral humana e canina na Turquia.

Pita-Pereira et al. (2012), no Novo Mundo, utilizaram a técnica de qPCR para diferenciação dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, também através da  $T_m$ . Foram testadas cepas de referência das seguintes espécies: *L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) shawi*. Para o subgênero *Leishmania* obtiveram  $T_m$  de  $77,34^\circ\text{C}$ , enquanto para o *Viannia*  $78,95^\circ\text{C}$ . Ensaios também foram realizados em amostras de

pacientes e flebotomíneos sabidamente infectados com *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*, com resultado igual ou muito próximo do obtido com as cepas de referência. Deste modo os autores indicam a técnica para diferenciação de espécies.

Paiva-Cavancanti et al. (2013), desenvolveram e validaram dois sistemas de *primers*, utilizando alvos para o DNA do cinetoplasto - kDNA (sistema denominado kDNA1) e DNA ribossomal (sistema SSUrDNA), capazes de detectar *Leishmania* spp. envolvidas com a etiologia da LTA no Brasil, além de *Leishmania (Leishmania) mexicana* e *Leishmania (Leishmania) panamensis*, encontradas em outros países da América. O sistema SSUrDNA foi mais específico, pois detectou apenas espécies do subgênero *Viannia*, embora tenha apresentado menor sensibilidade, com limite de detecção de 10 pg, quando comparado com o sistema kDNA1. Com limite de detecção de 0,1 fg e eficiência de 99,9%, o sistema kDNA1 se mostrou muito sensível, apesar de menos específico, devido a sua capacidade de detectar espécies dos subgêneros *Viannia* e *Leshmania*. Entretanto, ao ser testado em cepas de referência o sistema apresentou diferenças na *Tm* entre as espécies; sendo sugerida pelos autores, a investigação da significância deste resultado para caracterização de espécies em amostras biológicas.

### 3 JUSTIFICATIVA

Além da capacidade quantitativa, de acordo com trabalhos recentes publicados na literatura científica, a qPCR pode diferenciar as espécies através da  $T_m$  do produto amplificado, expressa na curva de dissociação, e superar as expectativas de um diagnóstico, que além de seguro, rápido, sensível, específico e com capacidade de quantificação da carga parasitária, ainda será capaz de caracterizar a espécie existente na amostra submetida à análise.

Considerando que cada espécie tem especificidade por um ou vários vetores e reservatórios, a identificação pode trazer informações epidemiológicas importantes sobre os possíveis focos da LTA, o que seria fundamental para contribuir com medidas de controle da doença. Além disto, as várias manifestações clínicas, decorrentes da enfermidade, estão diretamente ligadas ao agente etiológico, o qual ao ser identificado traria melhorias para o direcionamento do tratamento para paciente infectado, gerando conhecimentos para futuros estudos relacionados a novas terapias.

Os métodos clássicos para caracterização da espécie, tais como caracterização por meio de isoenzimas e anticorpos monoclonais são onerosos e exigem maior tempo para emissão do resultado além, das desvantagens apresentadas pelo cultivo, o qual é passível de contaminações (BESOUSSAN et al., 2006; SCHONIAN et al., 2003). Na tentativa de superar as desvantagens das técnicas clássicas, recentemente foram desenvolvidos pela equipe do Serviço de Referência em Leishmanioses (SRL) da FIOCRUZ-PE sistemas de diagnóstico para a LTA, baseados em qPCR; utilizando os sistemas kDNA1 e SSUrDNA, os quais apresentaram excelente performance em fragmentos de lesão cutânea de pacientes humanos e em sangue de cães (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013). Conforme citado anteriormente, durante o desenvolvimento desta metodologia diagnóstica, verificou-se em teste de especificidade, a capacidade do sistema kDNA1 em deslocar a curva de *melting* ou dissociação, de acordo com a cepa de referência utilizada.

Diante do exposto, em consonância com avanços da biologia molecular e com linha de pesquisa implementada desde 2008 pelo SRL-FIOCRUZ-PE, levando-se em consideração a complexidade da LTA e das variadas etiologias registradas em diferentes regiões do país; com limitações diagnósticas e de tratamento, associadas à diversidade de vetores e reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão, objetiva-se avaliar a aplicabilidade da PCR em tempo real como ferramenta para caracterização de *Leishmania* spp., contribuindo para ampliação dos

conhecimentos e direcionamento das medidas de terapia e controle de acordo com a espécie parasitária envolvida.



## 4 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicabilidade da PCR em tempo real como ferramenta para caracterização de espécies de *Leishmania* envolvidas na etiologia da LTA no Brasil.

### 4.1 Objetivos específicos

- a) Padronizar a Temperatura de *melting* ou dissociação da qPCR para diferenciação de *Leishmania* spp. envolvidas com a etiologia da LTA;
- b) Identificar, através da Temperatura de *melting* da qPCR, as espécies de *Leishmania* presentes em amostras biológicas positivas para LTA;
- c) Avaliar a Temperatura de *melting* da qPCR em amostras previamente caracterizadas pelo Serviço Nacional de Referência em Leishmanioses (SNRL) da FIOCRUZ-RJ;
- d) Efetuar RFLP e sequenciamento dos produtos de qPCR obtidos de amostras sabidamente positivas para LTA;
- e) Comparar os resultados da RFLP e sequenciamento com os resultados obtidos na qPCR.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Amostragem

Como amostragem foram utilizadas amostras de três diferentes origens.

#### 5.1.1 Cepas de referência

As cepas de Referência descritas no quadro 1 foram cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ-RJ para utilização nos ensaios de padronização da  $T_m$  por espécie de *Leishmania*.

**Quadro 1** - Isolados de *Leishmania* spp. aplicados em ensaios de PCR em tempo real para padronização da Curva de *melting* para caracterização das espécies envolvidas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana.

<b>Espécies</b>	<b>Código OMS</b>
<i>L. (V.) lainsoni</i>	MHOM/BR/1981/M6426
<i>L. (L.) amazonensis</i>	IFLA/BR/1967/PH 8
<i>L. (L.) mexicana</i>	MHOM/BZ/1982/BEL 21
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1975/M4147
<i>L. (V.) panamensis</i>	MHOM/PA/1971/L5 94
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903
<i>L. (V.) naiffi</i>	MDAS/BR/1990/M5533
<i>L. (V.) shawi</i>	IWHI/BR/1999/M17904

Fonte: A autora.

#### 5.1.2 Amostras de Campo

A amostragem foi de conveniência, de acordo com o número de animais e/ou pacientes com suspeita clínica de LTA encaminhados para diagnóstico pela Rede de Referência em leishmanioses da FIOCRUZ que aceitaram participar da pesquisa. Desta forma, amostras de sangue foram trazidas ao SRL, do CPqAM/FIOCRUZ-PE e submetidos aos procedimentos necessários para obtenção do diagnóstico final e caracterização parasitária.

Durante o período de 2010 a 2011 foram encaminhadas ao SRL/FIOCRUZ-PE 280 amostras de sangue de animais domésticos (275 cães e 05 gatos). Destas 235 foram

procedentes do município de Passira (07° 59' 42" S 35° 34' 51" O), Agreste Setentrional de Pernambuco, com uma população de 28.589 habitantes, o município apresenta a agricultura como principal atividade econômica (PERNAMBUCO, 2013). Outras 45 amostras foram provenientes de uma área rural localizado no município de Igarassu (7 ° 50'02" S, 34 ° 54'21" O), litoral norte (região metropolitana de Recife), com cerca de 1.507 habitantes, que também dedicam-se à agricultura.

### 5.1.3 Amostras previamente caracterizadas

Dez amostras de DNA, provenientes de pacientes humanos, previamente caracterizadas por análise enzimática (BRITO et al., 2009; CUPOLILLO et al., 1994, 1995) foram cedidas pela Coleção Biológica da Rede de Referência em Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/RJ e SRL/FIOCRUZ-PE, foram utilizados para classificação em espécies pela  $T_m$  e análise de concordância com a qPCR padronizada no item 5.2.2.

## 5.2 Processamento das amostras

### 5.2.1 Extração de DNA

Para extração de DNA das cepas de referência, amostras previamente caracterizadas por análise enzimática e amostras de sangue foi utilizado o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), o qual é compatível com diferentes espécimes biológicos, seguindo as instruções do fabricante, tendo como rendimento final o DNA extraído eluído em 200  $\mu\text{L}$  de tampão, em uma concentração estimada de 20-60 ng/  $\mu\text{L}$  (sangue) e 100-150 ng/  $\mu\text{L}$  (*pellet* de células). O DNA das amostras foi destinado aos ensaios a seguir.

### 5.2.2 Padronização da $T_m$ por espécie de *Leishmania*

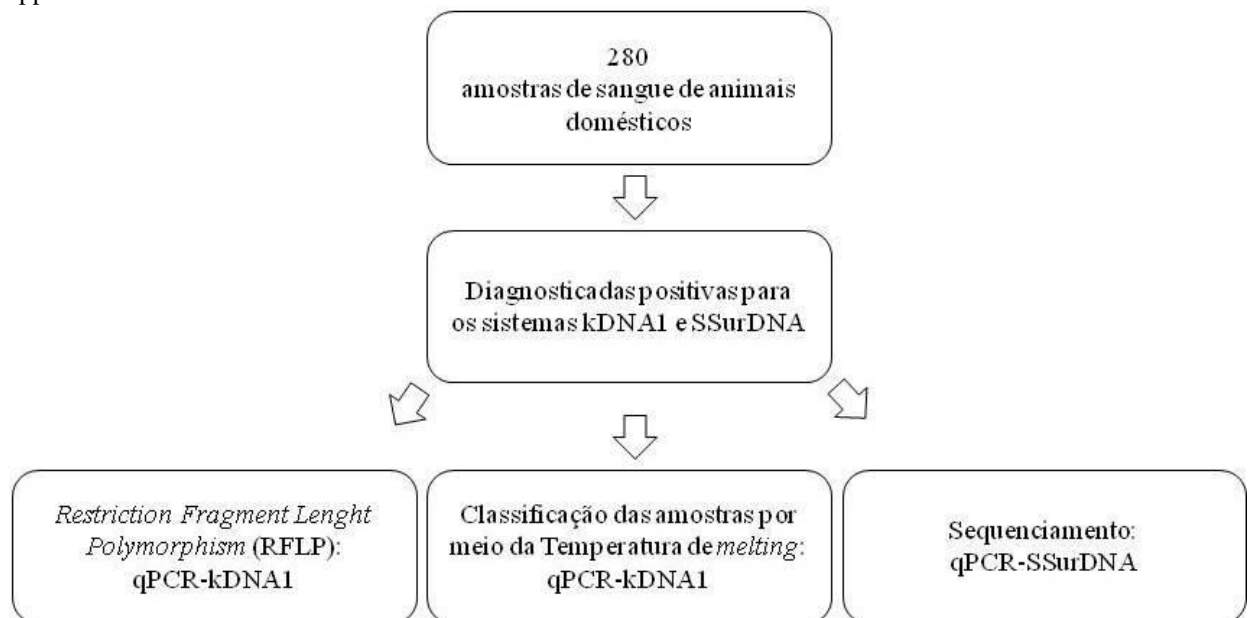
Para verificar as variações da  $T_m$  por espécie de *Leishmania*, foi necessário uma padronização da curva de *melting*. Para tanto, foram utilizadas as cepas descritas no quadro 1 (Item 5.1.1) em três diferentes concentrações (0,5 ng/ $\mu\text{L}$ ; 50 pg/ $\mu\text{L}$ ; 5 pg/ $\mu\text{L}$ ). Foram realizados 07 experimentos utilizando o sistema kDNA1 de acordo com Paiva-Cavalcanti et al. (2013).

Os experimentos foram efetuados com o aparelho ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, CA, USA), em condições padrões. A análise, interpretação e registro dos resultados foram efetuados com o auxílio do *software* ABI PRISM 7500 SDS (versão 1.4).

### 5.2.3 Diagnóstico da LTA

O diagnóstico foi realizado nas 280 amostras de sangue destinadas ao SRL/FIOCRUZ-PE, utilizando os dois sistemas kDNA1 (5' ATGCCTCTGGGTAGGGGCGTTC<sup>3'</sup> e 5' GGGAGCGCGGCCCACTATATT<sup>3'</sup>) e SSUrDNA (5' CGACAAGCGCTCTCCC<sup>3'</sup> e 5' CCCAGTACGTTCTCCC<sup>3'</sup>) de acordo com Paiva-Cavalcanti et al. (2013). Considerando que o primeiro sistema (kDNA1) é mais sensível e o segundo (SSU rDNA) mais específico (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013), foram utilizadas para classificação pela *T<sub>m</sub>* os resultados concordantes para os dois sistemas, e em seguida destinadas aos ensaios conforme demonstrado no fluxograma abaixo:

**Figura 4** - Fluxograma do processamento das amostras destinadas ao Serviço de Referência em Leishmanioses da FIOCRUZ-PE para determinação do diagnóstico, inclusas para avaliação da aplicabilidade da técnica de PCR quantitativa em tempo real para caracterização de *Leishmania* spp.



Fonte: A autora.

#### 5.2.4 Classificação das amostras por meio da $T_m$

Amostras de sangue positivas, provenientes dos animais domésticos, nos dois sistemas (kDNA1 e SSUrDNA), bem como as amostras previamente caracterizadas por isoenzimas, foram submetidas à análise da  $T_m$  e classificadas conforme a padronização estabelecida neste estudo (Item 5.2.2).

#### 5.2.5 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Os produtos da qPCR-kDNA1 para as cepas de referência (Quadro 1) (Controles positivos) foi submetido à RFLP para desenvolvimento do padrão de bandamento para cada espécie de *Leishmania*. A reação foi composta por 10  $\mu$ L do produto da qPCR, 2  $\mu$ L do tampão 10x, 1  $\mu$ L da enzima Hae III e 7  $\mu$ L de água tipo 1, a mistura foi incubada por 2 horas à 37°C. Em seguida foi realizada eletroforese do produto em gel de agarose à 4%, corado com brometo de etídio e usado como marcador molecular o Ladder 25 pb (Invitrogen, Life Technologies).

As amostras positivas foram submetidas à RFLP, sendo caracterizadas à nível de espécie conforme o padrão estabelecido.

#### 5.2.6 Sequenciamento dos produtos

*Amplicons* obtidos após qPCR para o alvo SSU rDNA (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013) foram purificados usando o PureLink Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo kit (Invitrogen, Life Technologies) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram encaminhados ao Laboratório Central da Universidade Federal de Pernambuco (LabCen-UFPE) para realização do sequenciamento, utilizando BioDye Terminator Cycle Sequencing Kit (version 3.1) (Applied Biosystems) em um sequenciador automático (ABI 3100 Genetic Analyzer). As sequências foram determinadas em única direção, utilizando o *primer forward*. As sequências obtidas foram submetidas ao *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) - BLASTn para análise de homologia.

### 5.3 Análise dos dados

A análise estatística foi realizada com o programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007). A padronização da  $T_m$  (Item 5.2.2) foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) com Teste Tukey e ANOVA com Teste Dunnett, foram consideradas diferenças estatísticas significativas quando  $p < 0.05$ .

As análises comparativas entre PCR-RFLP, qPCR e sequenciamento nas amostras biológicas, bem como a análise de concordância entre MLEE e qPCR, foram realizadas por meio de estatística descritiva, com distribuições absolutas e percentuais; os dados foram comparados usando o Teste Qui-Quadrado de Aderência para proporções esperadas iguais e teste Exato de Fisher aos níveis de 5% e 1% de significância, respectivamente.

## **6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Este estudo surgiu a partir dos resultados obtidos com o projeto “População de ectoparasitos em animais domésticos e sua relação com a epidemiologia das leishmanioses no Estado de Pernambuco”, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ-RJ (Licença LW-1/11- ANEXOS A e B).

Os proprietários dos animais, que foram direcionados ao diagnóstico pelo SRL/FIOCRUZ-PE, foram convidados a participar da pesquisa e a assinar um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A), autorizando a utilização do material coletado para fins científicos. Após a autorização, parte do material coletado e encaminhado ao SRL foi destinado às análises do estudo.

Uma vez que o projeto apresenta perspectivas para ampliação das análises em amostras provenientes de pacientes humanos, o mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do CPqAM / FIOCRUZ-PE com validade até fevereiro de 2017 (Parecer Plataforma Brasil 551.527- ANEXO C).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Padronização da $T_m$ para diferenciação de espécies de *Leishmania*

Através da análise dos 07 experimentos de qPCR foi verificada diferença estatística significativa ( $p < 0.0001$ ) entre as  $T_m$  das diferentes espécies analisadas.

Através destes experimentos foram obtidas as seguintes médias das  $T_m$  por espécie:

- a) *Leishmania (Viannia) braziliensis* 79,69°C;
- b) *L. (V.) panamensis* 79,99°C;
- c) *L. (V.) lainsoni* 78,96°C;
- d) *L. (Leishmania) mexicana* 80°C;
- e) *L. (L.) amazonensis* 80,37°C;
- f) *L. (V.) guyanensis\** 79,41°C;
- g) *L. (V.) naiffi* 80,88°C ;
- h) *L. (V.) shawi* 79,78°C.

\*A média referente à *L. (V.) guyanensis* foi realizada utilizando seis dos sete experimentos, pois em um deles, devido a pequena quantidade de DNA presente na amostra, não houve amplificação.

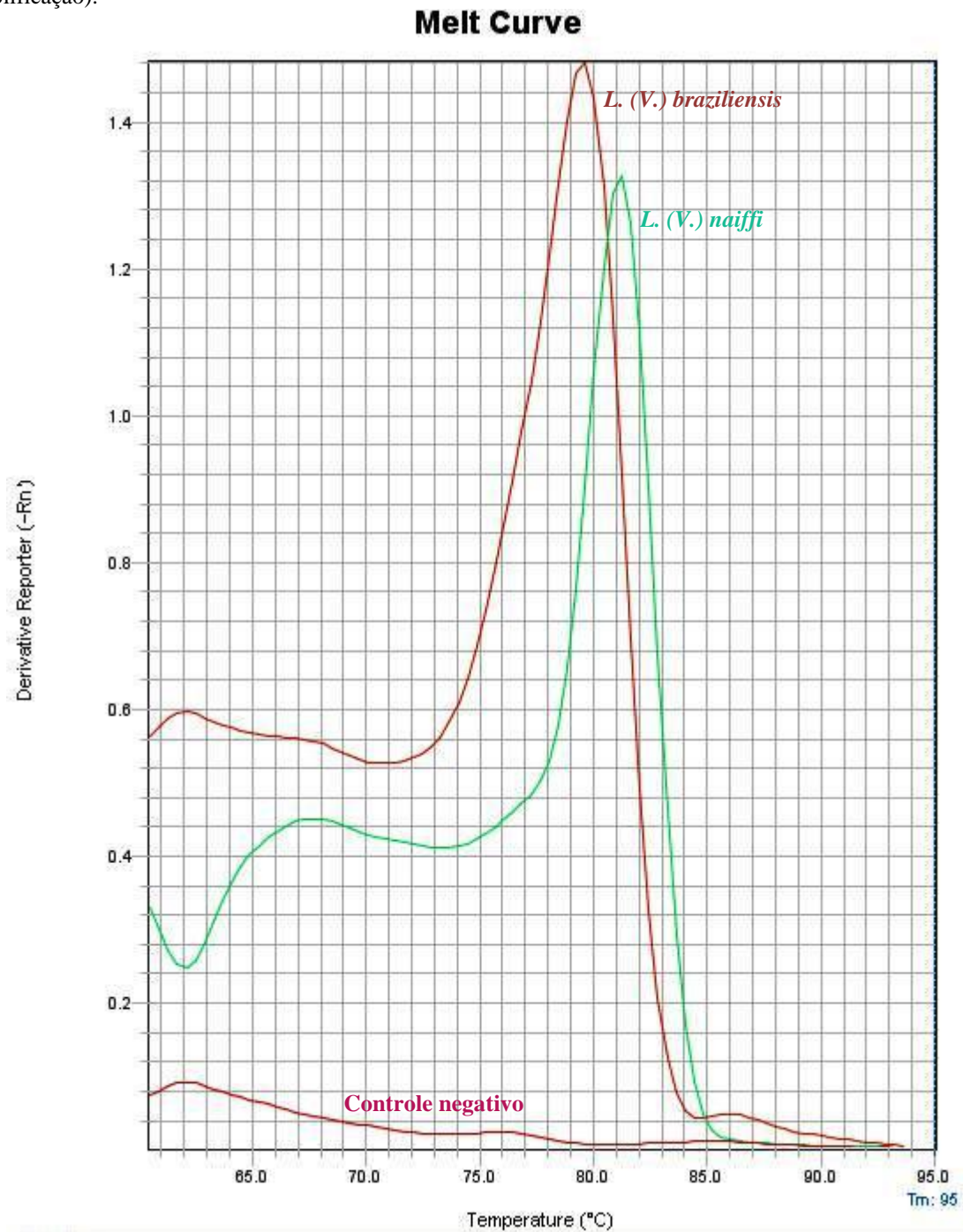
Com o auxílio da ANOVA (Tukey) observou-se diferença estatística significativa quando comparadas as  $T_m$  das seguintes espécies:

- 1) *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) naiffi* ( $p < 0,01$ );
- 2) *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) lainsoni* ( $p < 0,01$ );
- 3) *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) naiffi* ( $p < 0,05$ );
- 4) *L. (V.) lainsoni* e *L. (L.) mexicana* ( $p < 0,01$ );
- 5) *L. (V.) lainsoni*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis* ( $p < 0,01$ );
- 6) *L. (V.) lainsoni*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) naiffi* ( $p < 0,01$ );
- 7) *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) naiffi* ( $p < 0,05$ );
- 8) *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* ( $p < 0,01$ ).



Tomando-se a média da  $T_m$  obtida para *L. (V.) braziliensis* (79,69°C) como padrão de análise (ANOVA - Dunnett), verificou-se diferença significativa apenas em relação à *L. (V.) naiffi* (80,88°C;  $p < 0,01$ ) (Figura 5).

**Figura 5** - Curva de dissociação da PCR em tempo real para DNA de cepas de referência de *Leishmania (Viannia) braziliensis* ( $T_m = 79,69^\circ\text{C}$ ), *L. (V.) naiffi* ( $T_m = 80,88^\circ\text{C}$ ) e o controle negativo (sem amplificação).



Fonte: A autora

Diante das médias das  $T_m$  padronizadas foram criados os seguintes intervalos:

- a) **Intervalo 1:** amostras positivas para LTA que apresentarem  $T_m$  entre 78°C e 79,99°C; onde as prováveis espécies presentes na amostra serão *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni* ou *L. (V.) shawi*
- b) **Intervalo 2:** amostras que apresentarem  $T_m$  entre 80-82,2 °C serão classificadas como *L. (L.) mexicana* ou *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) naiffi*.

## 7.2 Diagnóstico da LTA em amostras de campo

Após o procedimento de extração de DNA, foi realizado o diagnóstico das 280 amostras, sendo 223 amostras positivas, de acordo com o critério estabelecido no item 5.2.3.

### 7.2.1 Classificação das amostras por meio da $T_m$

As 223 amostras positivas foram utilizadas para classificação pela  $T_m$  e analisadas conforme os intervalos estabelecidos no item 7.1.

Assim, um total de 58 amostras foram inseridas no intervalo 1, enquanto 165 apresentaram  $T_m$  entre 80-82,2°C, sendo assim, classificadas como intervalo 2 (Tabela 1).

**Tabela 1** - Classificação das amostras positivas para leishmaniose tegumentar Americana conforme intervalo estabelecido para a média da temperatura de *melting* de ensaios de PCR em tempo real em cepas de *Leishmania* spp. de referência.

<b>Intervalo</b>	<b>Prováveis espécies</b>	<b>Nº de amostras</b>	<b>%</b>
1	<i>L. (V.) braziliensis</i> ou <i>L. (V.) panamensis</i> ou <i>L. (V.) guyanensis</i> ou <i>L. (V.) lainsoni</i> ou <i>L. (V.) shawi</i> .	58	26,01
2	<i>L. (L.) mexicana</i> ou <i>L. (L.) amazonensis</i> ou <i>L. (V.) naiffi</i> .	165	73,99
<b>Total</b>		<b>223</b>	<b>100,00</b>

Fonte: A autora.

Para as sete amostras (01 a 07) e os três zimodemos de *L. (V.) braziliensis* (Z26, Z27 e Z45) caracterizadas por isoenzimas, cinco foram enquadradas no intervalo 1, e cinco no intervalo 2 (Tabela 2).

**Tabela 2** - Classificação das amostras previamente caracterizadas por *Multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) em relação ao intervalo de análise para a temperatura de *melting* dos ensaios de PCR em tempo real, desenvolvidos neste estudo.

<b>Amostra</b>	<b>MLEE</b>	<b>T<sub>m</sub> - Amostra</b>	<b>Intervalo</b>
01	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	80,49 °C	2
02	<i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	80,49 °C	2
03	<i>Leishmania (L.) mexicana</i>	80,13 °C	2
04	<i>Leishmania (V.) shawi</i>	79,40 °C	1
05	<i>Leishmania (V.) lainsoni</i>	78,85 °C	1
06	<i>Leishmania (V.) naiffi</i>	80,13 °C	2
07	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	79,58 °C	1
Z26	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	79,79 °C	1
Z27	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	80 °C	2
Z45	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	79,79 °C	1

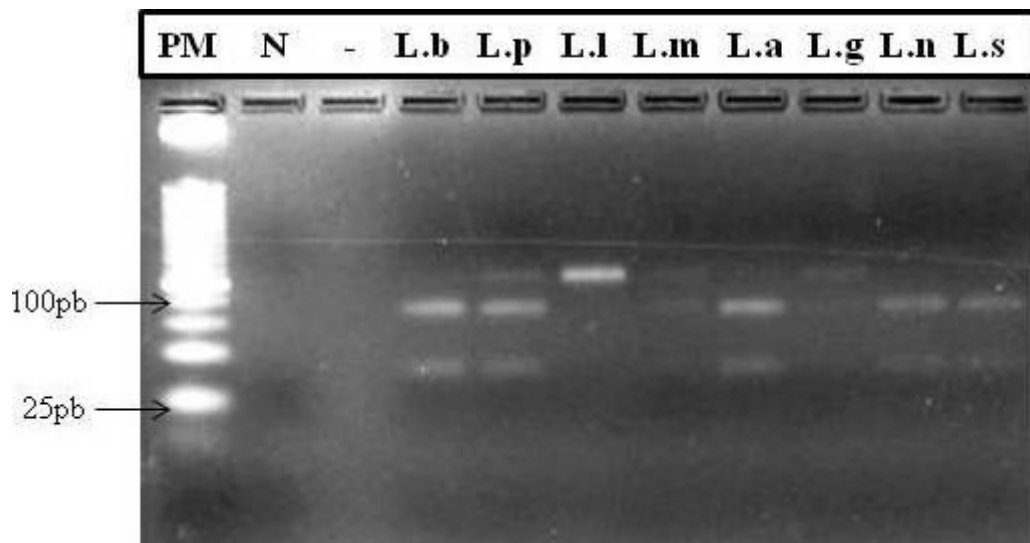
Fonte: A autora.

Legenda: T<sub>m</sub>: *melting temperature*

### 7.2.2 qPCR-kDNA e RFLP

Com o protocolo de qPCR-RFLP estabelecido (item 5.2.5), obtivemos o padrão de digestão enzimática para oito espécies conforme demonstrado na figura 6.

**Figura 6** - *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) utilizando os produtos da qPCR-kDNA1 obtidos de oito cepas de referência para *Leishmania* spp.



Fonte: A autora

Legenda: Lb: *Leishmania* (V.) *braziliensis*; Lp: *L. (V.) panamensis*; Ll: *L. (V.) lainsoni*; Lm: *L. (L.) mexicana*; La: *L. (L.) amazonensis*; Lg: *L. (V.) guyanensis*; Ln: *L. (V.) naiffi*; Ls: *L. (V.) shawi*. PM: Ladder 25pb (GibcoBRL-Life Technologies, USA). N: Controle Negativo. - : Poço sem amostra.

Entre as 223 amostras, 173 (77,58%) apresentaram bandejamento capaz de identificar a espécie do parasito, sendo 167 (96,53%) para *L. (V.) braziliensis*, 05 (2,89%) *L. (L.) mexicana* e 01 (0,58%) *L. (V.) panamensis*. As demais amostras (n= 50), não apresentaram digestão enzimática.

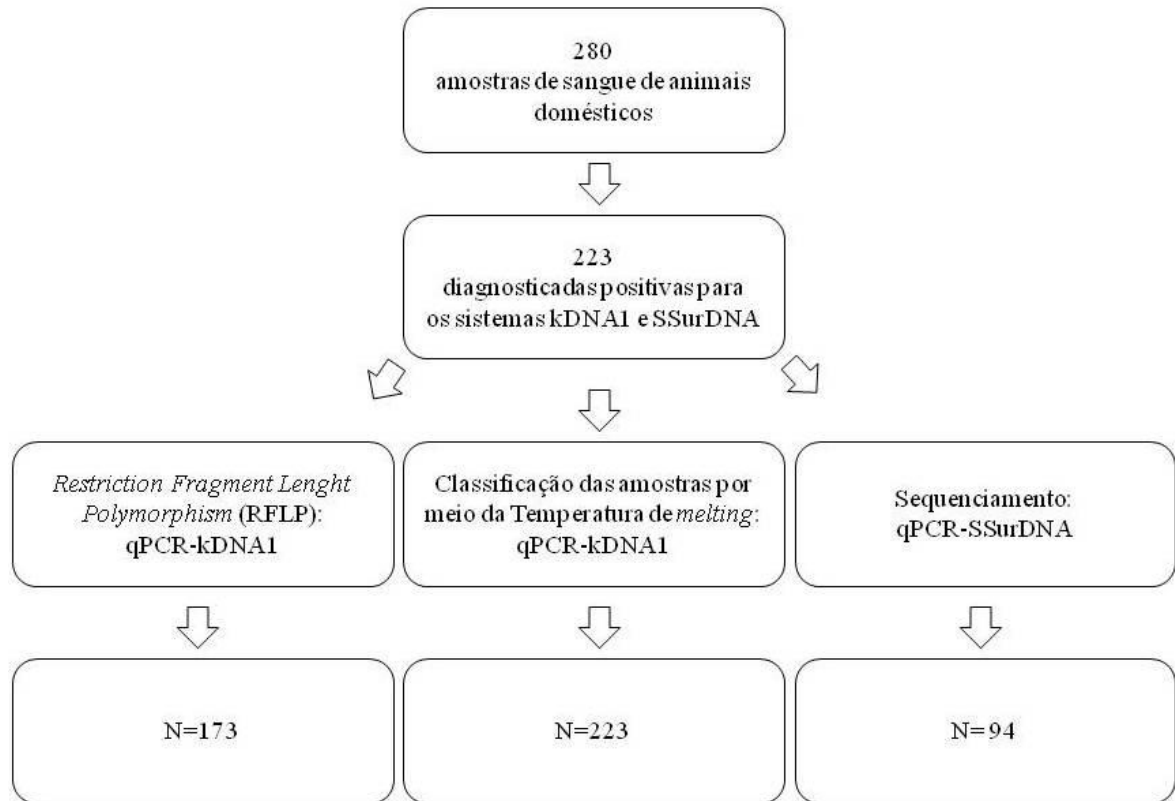
### 7.2.3 Sequenciamento

Os produtos da qPCR-SSurDNA de 223 amostras, foram encaminhados ao sequenciamento. As sequências de 94 amostras apresentaram qualidade para análise, com cobertura e identidade médias de 99%, compatíveis igualmente com *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis*. O eletroferograma das demais amostras não apresentou qualidade de análise adequada.

### 7.3 Análise comparativa

O fluxograma abaixo (Figura 7) demonstra o número de amostras compatíveis em cada ensaio, utilizadas para análise comparativa entre as técnicas.

**Figura 7** - Fluxograma do processamento das amostras e o N utilizado por técnica.



Fonte: A autora.

Legenda: N= número de amostras.

### 7.3.1 qPCR e MLEE

Das dez amostras caracterizadas pelo método padrão-ouro, oito tiveram concordância com o resultado obtido através da qPCR, havendo assim, 80% de concordância entre MLEE e qPCR (Tabela 3).

**Tabela 3** - Análise comparativa e concordância entre as técnicas de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) e *Multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE).

Testes	Intervalos		Total	
	1	2	N	%
qPCR	5	5	10	100
MLEE	7	3	10	100
Concordância	5	5	8	80
Valor de p			0,6499*	

Fonte: A autora.

Legenda: \*Teste Exato de Fisher

### 7.3.2 qPCR e RFLP

Das 173 amostras analisadas pela RFLP, 48 (27,75%) concordaram com o intervalo estabelecido neste estudo, enquanto 125 (72,25%) não concordaram (Tabela 4).

**Tabela 4** - Análise comparativa e concordância entre as técnicas de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP).

Testes	Intervalos		Total	
	1	2	N	%
<b>qPCR</b>	43	130	173	100
<b>RFLP</b>	168	5	173	100
<b>Concordância</b>	43	5	48	27,74
<b>Valor de <math>p</math></b>			<b>&lt; 0,001</b>	

Fonte: A autora.

### 7.3.3 qPCR e sequenciamento

A análise do sequenciamento para SSU rDNA enquadrar todas as espécies no intervalo 1, entre as 94 amostras analisadas, 41 (43,62%) concordaram com a análise do intervalo criada neste estudo, enquanto 53 (56,38%) apresentaram  $T_m$  correspondente ao intervalo 2 (Tabela 5).

**Tabela 5** - Análise comparativa e concordância entre as técnicas de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) e sequenciamento.

Testes	Intervalos		Total	
	1	2	N	%
<b>qPCR</b>	41	53	94	100
<b>Sequenciamento</b>	94	0	94	100
<b>Concordância</b>	41	0	41	43,62
<b>Valor de <math>p</math></b>			<b>0,2566</b>	

Fonte: A autora.

## 8 DISCUSSÃO

A identificação da espécie de *Leishmania* presente na amostra biológica é um dado importante para direcionamento do tratamento, mas infelizmente, apesar de confiáveis, os métodos clássicos são limitados e nem sempre estão disponíveis (MASMOUDÍ et al., 2013). A identificação juntamente com o diagnóstico, reduziria os custos e tempo, além da contribuição para medidas de controle com informações epidemiológicas sobre os parasitos circulantes e quais possíveis reservatórios estão presentes na área de estudo.

Em busca de um diagnóstico concomitante com a identificação da espécie presente em amostras positivas para leishmanioses, diversos autores verificaram a habilidade da variação da  $T_m$  obtida através da qPCR para este fim (KHOSRAVI et al., 2012; PITA-PEREIRA et al., 2012; TOZ et al., 2013). Com o objetivo de verificar uma diferença real entre as  $T_m$  para diferentes espécies de *Leishmania*, o primeiro passo foi avaliar esta variação estatística, entre as oito cepas de referência. Após a clareza matemática de que esta variação existe e é significativa ( $p < 0,01$ ), verificamos a utilização prática, ou seja, a qPCR passou a ser avaliada em amostras biológicas, sendo necessário uma análise comparativa com técnicas clássicas.

O uso da técnica de qPCR para diferenciar as espécies *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica*, ambas responsáveis pela LT no Velho Mundo, demonstrou diferença entre as  $T_m$  de 1,8°C, sendo possível a identificação rápida do parasito nesta região (KHOSRAVI et al. 2012). Utilizando cepas de referência caracterizadas por MLEE, Toz et al. (2013) padronizaram a  $T_m$  da qPCR para *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica* com  $T_m$  iguais a 68°C, 62°C e 58°C, respectivamente. Toz et al. (2013) conseguiram elevadas variações de  $T_m$  entre as cepas, possibilitando a diferenciação a nível de espécie. Em contrapartida, no presente estudo, como foram analisadas múltiplas espécies, foi necessária a criação dos intervalos para classificação das mesmas, impossibilitando a caracterização em nível de espécie.

No Novo Mundo, há uma grande diversidade de espécies relacionadas com a etiologia da LT (LAINSON; SHAW, 2005) como também, de manifestações clínicas em decorrência destas espécies. Levando isto em consideração, o intervalo 1 ( $T_m$ : 78-79,99°C) estabelecido, compreende as espécies que causam LCL e também as que podem ocasionar a evolução clínica para LMC (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis*); enquanto no intervalo 2 ( $T_m$ : 80-82,2°C) inclui-se *L. (L.) amazonensis*, que causa a manifestação mais grave e rara da LT, a LDf.

A definição do objetivo para a utilização da PCR é fundamental para escolha do alvo que será amplificado. Para fins de identificação de espécies de *Leishmania* utilizando a RFLP,

os autores têm escolhido alvos como ITS1 e HSP70 (EL-BESHBISHY; AL-ALI; EL-BADRY, 2013), enquanto para diagnóstico, o DNA do cinetoplasto (kDNA) é o mais indicado (YEHIA et al., 2012).

O trabalho realizado por Volpini et al. (2004) utilizou o kDNA digerido com a enzima de restrição Hae III para RFLP, e obteve um padrão de bandejamento em gel de poliacrilamida capaz de diferenciar as espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Assim como Volpini et al. (2004), no presente estudo, utilizando como alvo o kDNA, foram testadas oito diferentes espécies pela RFLP, o que torna a análise mais complexa, diante de um número elevado de espécies em análise e do alvo não ser o mais indicado para este fim mas, apesar disso obteve-se reprodutibilidade, ainda que visualizada em gel de agarose.

Devido à dificuldade de análise em 50 amostras, a maioria destas apresentando carga parasitária inferior a 30fg, através deste estudo pode-se constatar que para melhor reprodutibilidade da RFLP, as amostras precisam ter uma quantidade de DNA alvo moderadamente alto, ou seja, os pacientes precisam apresentar uma carga parasitária elevada.

O alvo da SSurDNA, possui várias aplicações, tais como, diagnóstico para estudos epidemiológicos em populações caninas (WANG et al., 2011) e caracterização de espécies (VAN EYS et al., 1992). O sistema SSurDNA, desenvolvido por Paiva-Cavalcanti et al. (2013), foi usado no presente estudo para sequenciamento e diagnóstico, e corroborando com os autores, o sistema possui alta especificidade para o subgênero *Viannia*, o que foi possível observar a partir do sequenciamento. Acordando ainda com Paiva-Cavalcanti et al. (2013), o sistema apresentou baixa sensibilidade, onde as amostras com carga parasitária baixa não tiveram êxito na reação de sequenciamento, assim apenas 42,15% das amostras apresentaram sequências com qualidade na cobertura e identidade.

Considerando a concordância de 80% entre a qPCR e a técnica padrão-ouro para caracterização de espécies de *Leishmania*, a MLEE (BRITO et al., 2012), e através da análise estatística é possível concluir que a qPCR é uma técnica tão boa quanto a MLEE, uma vez que não houve diferença estatística significativa ( $p = 0,6499$ ), revelando que são equivalentes. Porém, como perspectiva e para uma melhor avaliação, faz-se necessário aumentar o número de amostras caracterizadas testadas na qPCR uma vez que, a comparação entre estas técnicas foi realizada em apenas 10 amostras.

Em relação à RFLP e qPCR, observou-se diferença estatística significativa ( $p < 0,001$ ). Embora a RFLP seja uma técnica bastante utilizada e indicada para fins de diferenciação da espécie de *Leishmania* (BENSOUSSAN et al., 2006; EL-BESHBISHY; AL-ALI; EL-BADRY, 2013). Neste trabalho foram observadas dificuldades na análise de



bandeamento de amostras com baixa carga parasitária após digestão enzimática, também observada por outros autores (BEN ABDA et al. 2011) . O trabalho realizado por BEN ABDA et al. (2011), comparou a análise da  $T_m$  da qPCR e RFLP para diferenciação de espécies de *Leishmania*, e mesmo reconhecendo a praticidade de realizar a RFLP para este fim, comparado com o padrão-ouro (MLEE), também considera a análise e reprodutibilidade do padrão de bandeamento uma forte limitação entre laboratórios.

Para validar seus resultados, Toz et al. (2013) testaram amostras de animais e humanos através da qPCR e realizaram sequenciamento. Assim, obtiveram concordância entre os métodos de 98,03%. A análise estatística comparativa entre sequenciamento e qPCR realizado neste estudo mostrou que não há diferença estatística entre os métodos ( $p = 0,2566$ ), permitindo assim, o uso da qPCR como ferramenta que pode, através dos intervalos criados, direcionar a identificação de espécies de *Leishmania*, assim o resultado obtido na qPCR equivale ao obtido no sequenciamento.

Levando em consideração os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, Pita-Pereira et al. (2012) empregaram a qPCR para diferenciar espécies referentes a esses subgêneros. Assim, padronizaram  $T_m$  de 77,34°C para *Leishmania* e 78,95°C para *Viannia*. Deste modo, Pita-Pereira et al. (2012) consideraram que a qPCR pode ser usada para diferenciar infecções causadas por *L. (Leishmania) infantum* e *L. (Viannia) braziliensis*. É importante salientar que estas duas espécies estão relacionadas a formas clínicas diferentes. No presente estudo objetivou-se diferenciar etiologias associadas a uma mesma forma clínica (LTA), sendo desenvolvidos os intervalos de análise para o enquadramento das diferentes espécies Pita-Pereira et al. (2012) também usaram cepas de *L. (L.) amazonensis* e não conseguiram  $T_m$  que diferenciasse de *L. (L.) infantum*, do mesmo modo testaram *L. (V.) shawi* a qual não diferenciou de *L. (V.) braziliensis*. Assim, o trabalho faz ênfase a diferenciação dos subgêneros, mais especificamente entre *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*.

O estudo realizado por Paiva-Cavalcanti et al. (2013), utilizando o sistema kDNA1, demonstrou variações da  $T_m$  entre as espécies analisadas, levando os autores a sugerir uma análise da significância dessas variações. Com o presente trabalho, pode-se confirmar a importância da técnica para o direcionamento da espécie de *Leishmania* presente na amostra por meio de intervalos de análise, os quais são comparáveis à técnicas clássicas para este fim, como o MLEE e o sequenciamento.

## 9 CONCLUSÕES

Frente aos resultados obtidos observou-se que:

- a) Para caracterização das espécies relacionadas com uma mesma forma clínica (LTA), foi necessário uma padronização da  $T_m$  por meio de intervalos de análise;
- b) O enquadramento de amostras positivas para LTA, provenientes de áreas endêmicas do estado de Pernambuco nos dois intervalos de análise, demonstra que outras espécies, além de *L. (V.) braziliensis*, podem estar circulando no estado, relacionadas a dificuldades de tratamento e controle; porém, para uma confirmação deste dado, faz-se necessário o acompanhamento clínico-terapêutico dos pacientes;
- c) A análise comparativa entre as técnicas clássicas e a qPCR demonstra que, na impossibilidade de realização da MLEE ou sequenciamento, a qPCR pode ser utilizada com segurança para o direcionamento da espécie presente na amostra em análise; porém em relação a RFLP, as duas técnicas não são equivalentes;
- d) Desta forma, conclui-se que a qPCR é aplicável para fins de caracterização de espécies, podendo direcionar à presença de uma ou mais etiologias na amostra em análise.

## 10 PERSPECTIVAS

A qPCR é uma ferramenta versátil que permite a realização de ensaios espécie-específicos por meio da tecnologia *TaqMan probe* (AppliedBiosystems®); desta forma, espera-se ampliar os conhecimentos em caracterização de espécies por meio do desenho de sondas, bem como através deste futuro trabalho, contribuir aos pacientes participantes da pesquisa, fornecendo-lhes informações sobre carga parasitária e identificação do parasito. Espera-se também relacionar a evolução clínica em resposta ao tratamento com a espécie identificada.

## REFERÊNCIAS

- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- AMATO, V. et al. Treatment of mucocutaneous leishmaniasis with pentamidine isothionate. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, Paris, v. 125, p. 492-495, 1998.
- AMATO, V. S. et al. Mucosal leishmaniasis Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, Basel, v. 105, p. 1-9, 2008.
- AYRES, M. et al. **BIOESTAT: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. Belém: Instituto Mamiraua, 2007.
- AZMI, K. et al. Methods incorporating a polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism and their use as a ‘gold standard’ in diagnosing Old World cutaneous leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 71, p. 151-155, 2011.
- BAILEY M. S. Local Treatments for Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**. p. 1-3, 2013.
- BART, A. et al. Imported leishmaniasis in the Netherlands from 2005 to 2012: epidemiology, diagnostic techniques and sequence-based species typing from 195 patients. **Euro Surveillance**, Saint-Maurice, v. 18, n. 30, p. 20544, 2013.
- BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.
- BEN ABDA, I. et al. Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 105, n. 1, p. 17-22, 2011.
- BENSOUSSAN, E. et al. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, 2006, v. 44, n. 4, p. 1435-1439.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological Surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 93, p. 488-494, 1999.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. rev. atual. Brasília: Ed. Ministério da Saúde, 2010.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: Ed. Ministério da Saúde, 2007.

BRITO, M. E. F. et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 45, p. 1-4, 2012.

BRITO, M. E. F. et al. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, DC, v.7, n.2, p.318-321, 2000.

BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 14, p. 1278-1286, 2009.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CASTILHO, T. M. et al. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 78, p. 122-132, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/>>. Acesso em: 27 maio 2014.

CUBA CUBA, C. A. et al. A focus of mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia, Brazil: characterization and identification of *Leishmania* stocks isolated from man and dogs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 79, p. 500-507, 1985.

CUBA-CUBA, C. A. et al. Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Santiago Del Estero, Argentina: Identification of parasites by monoclonal antibodies and isoenzymes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 413-421, 1996.

CUPOLILLO, E. et al. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 73, p. 145-155, 1995.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Deerfield, v. 50, p. 296-311, 1994.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, Copenhagen, v. 22, p. 491-502, 2009.

EL-BESHBISHY, H. A.; AL-ALI, K. H.; EL-BADRY, A. A. Molecular characterization of cutaneous leishmaniasis in Al-Madinah Al-Munawarah province, western Saudi Arabia. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 17, p. e334-e338, 2013.

EL TAI, N. O. et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania cf. novani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 94, p. 1-5, 2000.

FLOCH, H. *Leishmania tropica guyanensis* n.ssp., agent de La leishmaniose tégumentaire des Guyanas et de l'Amérique Centrale. **Archives de Institut Pasteur de La Guyane Française**, Cahors, v. 15, p. 1-4, 1954.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, p. 214-221, 2006.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, p. 293-307, 2012.

HAJJARAN, H. et al. Direct Diagnosis of Leishmania Species on Serosity Materials Punctured From Cutaneous Leishmaniasis Patients Using PCR-RFLP. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 25, p. 20-24, 2011.

IKONOMOPOULOS, J. et al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the propose assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, New York, v. 113, p. 99-113, 2003.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 21, n. 2, p. 123-152, 1995.

KHOSRAVI, S. et al. Molecular diagnosis of Old World leishmaniasis: Real-time PCR based on trypanothione peroxidase gene for the detection and identification of *Leishmania* spp. **Journal of Vector Borne Diseases**, Delhi, v. 49, p.15-18, 2012.

KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVÁ, M. Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, San Francisco, v. 19, p. 1443-1474, 2012.

LACERDA, M. M. The Brazilian leishmaniasis control program. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 489-495, 1994.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis. In: FEG Cox et al. (Org.). **Topley & Wilson s Microbiology and Microbial Infections**. 10 ed. London: Hodder Arnold, 2005, v. 2, p. 313-349.

LAINSON, R. et al. *Leishmania (Viannia) shawi* n.sp., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v. 64, p. 200-207, 1989.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp.n., a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v. 64, p. 3-9, 1989.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Leishmaniasis of the New World, taxonomic problems. **British Medical Bulletin**, London, v. 28, p. 44-48, 1972.

LEISHMANIASIS (Cutaneous and Visceral). 2009. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>>. Acesso em: 28 maio 2014.

LINDOSO, J. A. L. et al. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, Auckland, v. 3, p. 69-77, 2012.

MARINHO-JÚNIOR, J. F. **Infecção natural por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos envolvidos na manutenção da leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da zona da mata norte de Pernambuco, Brasil.** 2010. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

MARY, C. et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 42, n. 11, p. 5249-5255, 2004.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: As leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 63, p. 82-104, 1992.

MASMOUDÍ, A. et al. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. **Journal of Dermatological Case Reports**, Warsaw, v. 2, p. 31-41, 2013.

MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **The Quarterly Journal of Medicine**, Oxford, v. 107, p. 7-14, 2013.

MATTA, A. Sur les leishmanioses tégumentaires. Classification générale des leishmanioses. **Bulletin de La Société de Pathologie Exotique**, Paris, v. 9, p. 494-503, 1916.

MICHALSKY, E. M. et al. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 5, p. 255-259, 2002.

MORTARINO, M. et al. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. **Parasitologia**, Roma, v. 46, n. 1-2, p.163-167, 2004.

NICOLAS, L. et al. Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 40, n. 5, p. 1666-1669, 2002.

NICOLAS, L. et al. *Leishmania major* reaches distant cutaneous sites where it persists transiently while persisting durably in the primary dermal site and its draining lymph node: a study in laboratory mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, p. 6561- 6566, 2000.

NICOLAS, L.; MILON, G.; PRINA, E. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 51, p. 295-299, 2002.

OLIVEIRA-NETO, M. P. et al. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 37, p. 846-849, 1998.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global Health Observatory Map Gallery**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 3 dez. 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 5 maio 2014

PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. **Molecular and cellular Probes**, London, v. 27, p. 122-128, 2013.

PAIVA-CAVALCANTI, M. **Desenvolvimento e avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães**. 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

PERNAMBUCO. Secretaria de Planejamento de Gestão. **Base de dados do Estado**. Disponível em: <<http://www.bde.pe.gov.br/ArquivosPerfilMunicipal/PASSIRA.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2013.

PITA-PEREIRA, D. et al. SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, London, v. 12, p. 5-1, 2012.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p. 937-954, 2009.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROLÃO, N. et al. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzymelinked immunosorbent assay. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90, n. 5, p. 1150-1154, 2004.

ROURA, X.; SANCHEZ, L.; FERRER, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. **Veterinary Record**, London, v.144, p. 262-264, 1999.

SANTIS, B. et al. Characterization of *Leishmania infantum* species in dogs from the urban area of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 44, n. 6, p. 771-773, 2011.

SCHONIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 47, p. 349-358, 2003.



SHAW, J. J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil X. Some observations on intradermal reaction to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 69, p. 323, 1975.

SILVEIRA, F. T. et al. Dermal leishmaniasis in the Amazon Region of Brazil, *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp.n., a new parasite from the State of Pará . **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 289-292, 1987.

SILVEIRA, F.T. et al. 2002. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n.sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite**, Paris, v. 9, p. 43-50, 2002.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (Brasil). **Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan net**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 6 maio 2014.

SKRABA, C. M. et al. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 78, n. 4, p. 411-417, 2014.

TOZ, S. O. et al. A Real-Time ITS1-PCR Based Method in the Diagnosis and Species Identification of *Leishmania* Parasite from Human and Dog Clinical Samples in Turkey. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e2205, 2013.

VAN EYS, G. J. et al. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 51, p. 133-142, 1992.

VOLPINI A. C. et al. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta tropica**, Netherlands, v. 90, p. 31-37, 2004.

VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (Nota Preliminar). **Brasil Medico**, Rio de Janeiro, v. 25, p. 411, 1911.

VITALE, F. et al. TaqMan-Based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. **Academy of Sciences**, New York, v. 1026, p. 139-143, 2004.

WANG, J. Y. et al: The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in western China detected by PCR and serological tests. **Parasites & Vectors**, London, v. 4, p. 69-76, 2011.

WEIGLE, K. A. et al. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: A comparison of seven methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 36, n. 3, p. 489-496, 1987.

WEIRATHER, J. L. et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, p. 3892-3904, 2011.

WORTMANN, G. W. et al. Real-time polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis in Panama from both fresh and frozen tissue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 98, p. 148-151, 2004.

YEHIA, L. et al. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species identification: analysis of 122 biopsies with varied parasite index. **Journal of Cutaneous Pathology**, Copenhagen, 2012, n. 39, p. 347-355, 2012.

ZAULI, R. C. et al. A dysflagellar mutant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from a cutaneous leishmaniasis patient. **Parasites & Vectors**, London, v. 5, p. 11, 2012.

**APÊNDICE A - TCLE**

**CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA  
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Projeto:** População de ectoparasitos em animais domésticos e sua relação com a epidemiologia das leishmanioses no Distrito de Três Ladeiras – Igarassu/PE.

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, proprietário do animal \_\_\_\_\_, espécie \_\_\_\_\_

residente à rua/Av. \_\_\_\_\_,

bairro \_\_\_\_\_, cidade/estado \_\_\_\_\_, CEP: \_\_\_\_\_

aceito participar desse estudo, cujo objetivo é desenvolver um método de diagnóstico para as leishmanioses. Fui informado que meu animal será submetido à coleta de ectoparasitos (pulgas e carrapatos) e de sangue para os testes de diagnóstico da leishmaniose visceral / leishmaniose tegumentar americana no estudo acima referido, sem que haja nenhum dano à saúde do mesmo. A coleta de sangue será realizada com uso de agulha e seringa e, o animal poderá sentir um desconforto no momento em que a agulha for introduzida na pele, sendo retirado de 3 a 5 mL de sangue, o equivalente a duas ou três colheres de sopa; este processo também poderá causar uma mancha roxa no local que, desaparecerá com o tempo de, aproximadamente, sete dias. Durante a assinatura deste termo fui informado que os materiais coletados serão incorporados ao Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, podendo ser utilizados em pesquisas posteriores; e que tenho plena liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão por tal. Estou ciente que não haverá incentivo financeiro para participação nesta pesquisa, que este documento é emitido em duas vias, uma ficará comigo e outra com a equipe de pesquisa, tenho garantida de que não haverá divulgação de minha identidade ou de meu animal nos produtos gerados por este projeto.

Contatos: **Dr<sup>a</sup>. Milena de Paiva Cavalcanti, CPqAM/FIOCRUZ – Tel. (81) 2101-2679**

\_\_\_\_\_  
Sujeito da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Coordenador do projeto

Recife, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## ANEXO A - Certificado da licença na CEUA



### LICENÇA

LW-1/11

Certificamos que o protocolo (P-50/10-5), intitulado "POPULAÇÃO DE ECTOPARASITOS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SUA RELAÇÃO COM A EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES EM PERNAME" responsabilidade de MILENA DE PAIVA CAVALCANTI, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 13/12/2012 e inclui o uso total de :

*Canis familiaris*

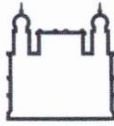
- 200 Machos.
- 200 Fêmeas.

*Felis sylvestris catus*

- 100 Machos.
- 100 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2010

Octávio Augusto França Presgrave  
Coordenador da CEUA

**ANEXO B - Termo aditivo da licença na CEUA**

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
 Fundação Oswaldo Cruz

 Vice-presidência de Pesquisa e  
 Laboratórios de Referência

**Comissão de Ética  
 no Uso de Animais**
**TERMO ADITIVO AO CERTIFICADO DA LICENÇA Nº LW-1/11 (P-50/10.5)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FIOCRUZ, em atenção à solicitação da Dr<sup>a</sup>. Milena de Paiva Cavalcanti autoriza o presente aditivo, conforme solicitação da proponente via carta s/nº, de 24 de agosto de 2012.

1. Prorrogação do prazo de validade da licença por um ano, sem acréscimo de animais.

Este aditivo tem validade até 13/12/2013.

Rio de Janeiro, 27 de agosto de 2012.

**Octavio Augusto França Presgrave**  
 Coordenador da CEUA/FIOCRUZ

**Octavio A. F. Presgrave**  
 Coordenador  
 CEUA/FIOCRUZ  
 SIAPE 04626550

Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz  
 Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ  
 Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

## ANEXO C – Parecer de aprovação no CEP



**Título do Projeto:** “Avaliação da aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real para caracterização de espécies de *Leishmania* spp”

**Pesquisador responsável:** Rayana Carla Silva de Moraes

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/Fiocruz

**Data de apresentação ao CEP:** 26/08/2013

**Registro no CAAE:** 21168213.0.0000.5190

**Número do Parecer PlatBr:** 551.527

## PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 05 de fevereiro de 2017.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 28 de março de 2014.

Vice-coordenador do CEP/CPqAM

Paul Hindenburg Nobre de V. Silva  
Analista de Gestão em Saúde  
Vice-Coordenador  
Mat. SIAPE 1558906  
CEP/CPqAM/Fiocruz