

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

JOANNA LUCIA DE ALMEIDA ALEXANDRE

DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA UTILIZANDO A
SALIVA COLETADA COM SWAB

Recife
2015

JOANNA LUCIA DE ALMEIDA ALEXANDRE

DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA UTILIZANDO A
SALIVA COLETADA COM SWAB

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de mestre em ciência.

Orientador: Dr. Sinval Pinto Brandão Filho

Co-orientador: Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues

RECIFE
2015

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

A381d Alexandre, Joanna Lucia de Almeida.
Diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana utilizando a saliva coletada com swab / Joanna Lucia de Almeida Alexandre. - Recife: s.n, 2015.

72 p. : ilus., graf., tab., mapas.

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

Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho; Co-orientadores: Eduardo Henrique Gomes Rodrigues.

1. Leishmaniose Cutânea – diagnóstico. 2. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 3. Saliva. 4. Leishmania. I. Brandão Filho, Sinval Pinto. II. Rodrigues, Eduardo Henrique Gomes . III. Título.

CDU 616.993.161

JOANNA LUCIA DE ALMEIDA ALEXANDRE

DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA UTILIZANDO A
SALIVA COLETADA COM *SWAB*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de mestre em ciência.

Data de aprovação: 23/03/2015

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sinval Pinto Brandão Filho
CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Zulma Maria de Medeiros
CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Rosana de Albuquerque Montenegro
CPqAM/FIOCRUZ

À minha mãe, Joceluce, por toda a dedicação, apoio, incentivo, abdições e, sobretudo o amor, que é minha fortaleza.

Ao meu pai, Delmirinho, que é meu anjo, e me guarda de onde está.

Aos meus avós, que são meu exemplo de força e determinação.

A Emanuel Vitor, meu amor, companheiro de todos os momentos, pela paciência, dedicação e amor, que foram fonte de perseverança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, força maior, por ter permitido e me apoiado em todas as minhas conquistas.

Aos familiares que de alguma forma sempre me deram força pra seguir em frente.

Ao meu orientador, Dr. Sinval Brandão-Filho, pelos ensinamentos na vida acadêmica e pela confiança depositada em desde o estágio de iniciação científica até o mestrado.

Ao Dr. Eduardo Rodrigues, pela sua competência, agradeço a amizade e ajuda incondicional em todas as fases deste trabalho, e pela sua contribuição em minha formação, não só acadêmica como pessoal e profissional.

A Roberto Werkhäuser, um pesquisador admirável, de conduta e competência inquestionáveis, a quem só tenho que agradecer pelos ensinamentos pessoais, políticos, espirituais e principalmente científicos, que fizeram toda a diferença em minha trajetória.

À Dr^a Maria Edileuza Brito, pelos ensinamentos, sabedoria, dedicação e amizade essenciais ao desenvolvimento de minha dissertação e deste trabalho.

A Juliana Viana, companheira de equipe, e amiga, agradeço pelos ensinamentos e compreensão em momentos difíceis, e pelo apoio.

A José Marinho Júnior e Dr^a Milena Paiva, por me auxiliarem nos experimentos, dúvidas, me apoiarem e direcionar minha formação acadêmica.

A Patrícia Areias, Amanda Vasconcelos, Camila Cavalcanti e Renata Lins amigas de faculdade, laboratório, mestrado e da vida, pela amizade, companheirismo, paciência e disposição em me ajudar durante todo esse tempo.

A Vanessa Fitipaldi, Suênia Gonçalves, Ericka Almeida, Andréia, Rômulo Pessoa, Rayana Moraes, Kamila Gaudêncio, Fábiana Soares, Luana, Valéria, Débora, Mineo Nakasawa, Suellen Braz, colegas de laboratório, pela ajuda em todos os momentos e também pelos momentos divertidos.

Aos demais pesquisadores do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, que contribuíram de várias formas para a realização deste trabalho;

Aos amigos da turma do Mestrado BBS 2013.1, por cada momento compartilhado. Estar com vocês tornou tudo mais simples e mais feliz

A CAPES por todo apoio financeiro cedido a este trabalho.

Aos pacientes que com toda compreensão, contribuíram para realização deste trabalho.

ALEXANDRE, Joanna Lucia de Almeida. **Diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana utilizando a saliva coletada com *swab***. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

RESUMO

As leishmanioses caracterizam-se por um espectro de doenças distribuídas endemicamente em regiões tropicais e subtropicais do mundo. A obtenção de material biológico para análise diagnóstica apresenta cuidados cruciais ao paciente, por se tratar de um processo invasivo, passível de inflamação, e podendo haver reativação da doença, em alguns casos. Diante do avanço das técnicas moleculares e da utilização de alguns fluidos biológicos para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), cogitou-se a possibilidade da identificação de DNA de *Leishmania* spp. em saliva através do método de coleta de *swab*, sendo contribuinte para o avanço no diagnóstico laboratorial. Assim, o propósito do estudo foi a identificação de DNA de *Leishmania* spp. a partir do diagnóstico molecular. Foram incluídos no estudo os pacientes que apresentaram lesões ativas, diagnósticos clínicos para LTA, antecedentes epidemiológicos compatíveis e não possuíam lesões cutâneo mucosas. O diagnóstico laboratorial envolveu a abordagem parasitológica através da pesquisa direta do parasito em amostras escarificadas de lesões, enquanto que o molecular compreendeu a extração do DNA das amostras de biópsia e *swab* salivar, seguidas da reação de PCR convencional (cPCR) e PCR em tempo real (qPCR). Foram investigados 40 pacientes com LTA havendo ocorrência de DNA do parasito em 10 amostras de saliva com cPCR, e 36 amostras utilizando qPCR. Em 28 amostras de biópsias também foi possível a detecção do DNA de *Leishmania* spp. e em 35 amostras de escarificado de lesão foram encontradas formas amastigotas do parasito, através de pesquisa direta. Na comparação entre os métodos propostos, a biópsia apresentou uma média de 50% de compatibilidade em relação a cPCR e 67,5% para a qPCR. A análise comparativa observou entre o diagnóstico parasitológico e os diagnósticos moleculares uma concordância de 32,5% (14/40) em relação a cPCR, enquanto que a qPCR obteve 75,5% (31/40) de concordância. Considerando a sensibilidade das técnicas de PCR utilizadas e o procedimento de coleta, através de *swab* advindo de fluidos salivares, os resultados demonstram a viabilidade do método de coleta de *Leishmania* spp. como uma nova abordagem diagnóstica auxiliar para a LTA, com benefícios à saúde do paciente.

Palavras-chave: Leishmaniose Cutânea – diagnóstico. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Saliva. *Leishmania*.

ALEXANDRE, Joanna Lucia de Almeida. **American Cutaneous Leishmaniasis diagnostic using saliva collected using a swab.** 2015. Dissertation (Masters in Bioscience and Biotechnology for Health) - Center Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

ABSTRACT

Leishmaniasis are characterized by a spectrum of diseases distributed endemic in tropical and subtropical regions of the world. Obtaining biological material for diagnostic analysis provides critical care to the patient, because it is an invasive procedure, subject to inflammation, and may be reactivation of the disease in some cases. Given the advances in molecular techniques and the use of some biological fluids for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis (ACL), has considered the possibility of *Leishmania* spp. DNA identification in saliva through the swab collection method, and contributor to the advance in laboratory diagnosis. Thus, the purpose of the study was to identify the DNA of *Leishmania* spp. from the molecular diagnosis. The study included patients who had active lesions, clinical diagnostics for LTA, compatible epidemiological history and not had mucous skin lesions. Laboratory diagnosis involved parasitological approach by direct detection of the parasite in samples scarified lesions, whereas the molecular understood extraction of DNA from biopsy samples and saliva swab, followed by conventional PCR (cPCR) and real-time PCR (qPCR). 40 patients were investigated with LTA there occurrence of parasite DNA in 10 cPCR saliva samples, and 36 samples using qPCR. In 28 samples biopsies was also possible to detect the DNA of *Leishmania* spp. and 35 samples of injury chiseled amastigote forms of the parasite were found by direct search. Comparing the proposed methods, the biopsy showed an average of 50% compatibility for cPCR and 67.5% for qPCR. The comparative analysis between the observed parasitological and molecular diagnostic concordance of 32.5% (14/40) for cPCR, while qPCR obtained 75.5% (31/40) agreement. Considering the sensitivity of PCR techniques used and the collection procedure through swab arising salivary fluid, the results demonstrate the viability of *Leishmania* spp. collection method as a new diagnostic approach to assist the ACL, with benefits to the health of the patient.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp.	16
Figura 2 -	Distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar no Mundo.	17
Figura 3 -	Distribuição da Leishmaniose Tegumentar Americana nas regiões do Brasil nos anos de 2012 e 2013.	18
Figura 4 -	Distribuição dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana notificados em Pernambuco, durante o período de 2004 a 2013.	18
Figura 5-	Formas Clínicas de Leishmaniose Tegumentar Americana.	22
Figura 6 -	Procedimento de biópsia, auxiliado por um punch.	23
Figura 7 -	Corante SYBR GREEN.	28
Figura 8-	Sonda TaqMan.	29
Figura 9 -	Micrografia eletrônica do kDNA de <i>Leishmania</i> spp.	30
Figura 10 -	Fluxograma representando todas as etapas do estudo.	32
Figura 11-	Coleta de biópsia cutânea.	34
Figura 12-	Coleta da amostra de saliva através de <i>swab</i> .	35
Figura 13-	Coleta de raspado da lesão.	35
Figura 14-	Eletroforese em gel de agarose a 1 % corado pelo brometo de etídeo, mostrando bandas específicas para <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> com limite de detecção de 10 fg de DNA padrão.	39
Figura 15-	Curva-padrão de <i>L. braziliensis</i> (IOC-L-566-MHOM/BR/75/M2903) com limite de detecção de 1 fg. A eficiência analítica da reação (ϵ) = 92,47%. Slope: -3,509; coeficiente de determinação (R^2): 0,99.	40
Figura 16-	Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o subgênero <i>Viannia</i> .	40
Figura 17-	Análise da detecção de <i>Leishmania (V.)</i> em saliva a partir da curva de amplificação. A eficiência analítica da reação (ϵ) = 92,47%. Slope: -3,509; coeficiente de determinação (R^2): 0,99.	41
Figura 18-	Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o subgênero <i>Viannia</i> .	42
Figura 19-	Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos de PCR de amostras de biópsia amplificados a partir de iniciadores específicos para o subgênero <i>Viannia</i> .	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características epidemiológicas da população selecionada durante o estudo.	34
Tabela 2- Comparação do desempenho dos substratos de biópsia e saliva através de cPCR.	43
Tabela 3- Comparação do desempenho dos substratos de biópsia (cPCR) e saliva através de qPCR.	43
Tabela 4- Resultados de diagnósticos parasitológicos e moleculares (cPCR) dos doentes que se enquadravam na definição de caso de LTA.	44
Tabela 5- Resultados de diagnósticos parasitológicos e moleculares (qPCR) dos doentes que se enquadravam na definição de caso de LTA.	45
Tabela 6- Comparação do diagnóstico molecular da LTA em saliva, através da PCR convencional e qPCR.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A-	Adenina
ABI-	Applied Biosystems Incorporated
CPqAM-	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
C-	Citosina
CEP	Comitê de ética em pesquisa com seres humanos
cPCR-	<i>Conventional polymerase chain reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase convencional)
C_t	Ciclo <i>threshold</i>
DNA-	Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucléico)
ddNTPs-	<i>Dideoxynucleotide triphosphates</i> (Dideoxinucleotídeo trifosfatos)
dNTP-	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i> (Desoxinucleotídeo trifosfato)
EDTA-	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido Etilenodiaminotetracético)
ELISA-	Enzyme linked immunosorbent assay (Teste imunoenzimático)
FIOCRUZ-	Fundação Oswaldo Cruz
fg-	Fentogramas
G-	Guanina
HCl	Ácido clorídrico
HUOC	Hospital Oswaldo Cruz
IFI-	Imunofluorescência Indireta
IDRM-	Intradermorreação de Montenegro
kb-	Quilobases
Kg-	Quilogramas
kDNA-	<i>Kinetoplasmic Deoxyribonucleic Acid</i> (DNA do cinetoplasto)
L.-	<i>Leishmania</i>
LCD-	Leishmaniose cutânea difusa
LCL-	Leishmaniose cutânea localizada
LCM-	Leishmaniose cutânea mucosa
LR-	Leishmaniose recidiva
LTA-	Leishmaniose tegumentar Americana
LV-	Leishmaniose Visceral
LVA-	Leishmaniose visceral
Lu.	<i>Lutzomyia</i>

MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MO-	Microscópio óptico
mRNA-	<i>Messenger Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucléico mensageiro)
MS-	Ministério da Saúde
ng-	Nanogramas
n-	Número
OH-	Hidroxila
OMS-	Organização Mundial de Saúde
pg-	Picogramas
pb-	Pares de base
PCR-	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PM	Peso molecular
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase quantitativa)
R²	Coefficiente de determinação
RNA-	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucléico)
Sb+ 5	Antimônio pentavalente
SFM-	Sistema Fagocítico Mononuclear
SINAN-	Sistema de Informações de Agravos e Notificação
spp.	Espécies
SRL-	Serviço de Referência em Leishmaniose
SVS-	Secretaria de Vigilância em Saúde
TAE-	Trisbase, Ácido bórico, EDTA
Taq-	<i>Thermus aquaticus</i>
T-	Timina
TCLE-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDR-	<i>The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases</i> (Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais)
Tris-	Trishidroxiaminometano
U-	Unidade
UPE-	Universidade de Pernambuco
UV-	Ultravioleta
V.	<i>Viannia</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICAVA	14
2	MARCO TEÓRICO CONCEITUAL	15
2.1	Aspectos gerais	15
2.2	Epidemiologia da Leishmaniose tegumentar Americana	16
2.3	Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana	19
2.3.1	Leishmaniose Cutânea Localizada.....	19
2.3.2	Leishmaniose Cutâneo Mucosa.....	20
2.3.3	Leishmaniose Cutâneo Difusa.....	21
2.3.4	Leishmaniose Recidiva.....	21
2.4	Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana	22
2.4.1	Métodos de coleta e substratos utilizados para o diagnóstico.....	22
2.4.2	Diagnóstico Clínico-epidemiológico.....	23
2.4.3	Diagnóstico Laboratorial.....	24
2.4.3.1	<u>Diagnóstico parasitológico</u>	25
2.4.3.2	<u>Imunodiagnóstico</u>	25
2.4.3.3	<u>Diagnóstico molecular</u>	26
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos específicos	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Desenho experimental	32
4.2	Aspectos éticos	33
4.3	Seleção de pacientes	33
4.3.1	Critérios de inclusão e exclusão do estudo.....	33
4.4	Coleta das amostras	34
4.5	Diagnóstico Parasitológico	36
4.6	Diagnóstico Molecular	36
4.6.1	Extração e purificação de DNA genômico	36
4.6.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	36
4.6.2.1	<u>Limite de detecção dos métodos moleculares</u>	36

4.6.2.2	<u>PCR Convencional (cPCR)</u>	37
4.6.2.3	<u>PCR Quantitativa em tempo Real (qPCR)</u>	38
4.7	Análise dos resultados	38
5	RESULTADOS	39
5.1	Limite de detecção dos métodos moleculares	39
5.2	Detecção do DNA de <i>Leishmania (V.) spp</i> por cPCR e qPCR, em fluidos salivares em pacientes com LTA	40
5.3	Comparação do desempenho dos substratos (saliva e biópsia) através do cPCR	41
5.4	Comparação do desempenho dos substratos saliva (qPCR) com amostras de biópsia (cPCR)	43
5.5	Comparação do diagnóstico parasitológico da LTA, através da pesquisa direta, com o diagnóstico molecular, por cPCR em fluidos salivares	44
5.6	Comparação do diagnóstico parasitológico da LTA, através da pesquisa direta, com o diagnóstico molecular, por qPCR em fluidos salivares	44
5.7	Comparação do diagnóstico molecular da LTA, através da cPCR e qPCR	45
6	DISCUSSÃO	46
6.1	Análise do perfil epidemiológico	46
6.2	Análise da detecção de <i>Leishmania (V.) spp</i>, em fluidos salivares	47
6.3	Comparação do desempenho dos substratos (biópsia e saliva) através do diagnóstico molecular	50
6.4	Comparação do desempenho dos substratos (biópsia e saliva) através do diagnóstico molecular	51
6.5	Análise comparativa entre as técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real para o diagnóstico molecular da LTA	51
7	CONCLUSÕES	53
8	PERSPECTIVAS	54
	REFERÊNCIAS	55
	Apêndice A- Termo de consentimento livre e esclarecido	67

Apêndice B- Tabela de pacientes analisados	69
Anexo A- Parecer do Comitê de Ética.....	71

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) trata-se de um importante agravo à saúde pública incluídas nas prioridades da Organização Mundial de Saúde, uma vez que acomete os seres humanos e os animais através de diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. É uma doença endêmica no estado de Pernambuco, assumindo crescentes focos epidêmicos em muitos municípios. O seu controle depende da disponibilidade de métodos acurados com alta sensibilidade e especificidade para detecção do parasito, que podem fornecer informações epidemiológicas relevantes para o planejamento de medidas adequadas.

Contribuindo com este quadro, o diagnóstico da doença enfrenta limitações, a obtenção de material para análise diagnóstica apresenta cuidados cruciais ao paciente, haja vista tratar-se de processos invasivos, passível de inflamação, infecção por outros organismos, podendo haver reativação da doença, em alguns casos. Em relação as técnicas utilizadas as limitações se referem ao lento crescimento de organismos em meios de cultivos artificiais, além de baixas sensibilidades e especificidades apresentadas em algumas abordagens. Para a OMS, é recomendável que as pesquisas se concentrem na geração de novos conhecimentos e, sobretudo na aplicação de novos paradigmas diagnósticos para a leishmaniose tegumentar, uma vez que a doença é considerada emergente e prioritária (REMME et al., 2002). Torna-se evidente o desenvolvimento, padronização e validação de testes diagnósticos mais sensíveis e com maior acurácia (PAIVA-CAVALCANTI, 2008; RODRIGUES, 2000).

Diante desses entraves, este projeto propôs estudar de forma mais explícita o elo entre três pontos fundamentais: a) a utilização do método de *swab* como instrumento não invasivo para a coleta de *Leishmania* spp., cujo procedimento assegura ao paciente conforto e segurança durante a rotina diagnóstica, b) o fluido salivar utilizado como substrato para a manutenção desses parasitos, até então raramente conhecido como fonte de escape de *Leishmania* proporciona um novo achado parasitológico, exclusivamente em indivíduos portadores de lesões cutâneas, e c) a aplicabilidade da PCR em tempo real como ferramenta sensível, indispensável para a análise quantitativa dos minicírculos do kDNA.

Portanto, o método proposto acarretará ao paciente simplicidade e conforto na coleta da amostra, sem riscos à saúde pela praticidade quanto à maneira e ao local de coleta de parasitos. Por outro lado, promoverá uma nova discussão quanto à natureza desses achados acerca de questões pertinentes ao tropismo da *Leishmania* spp. em substrato salivar.

2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

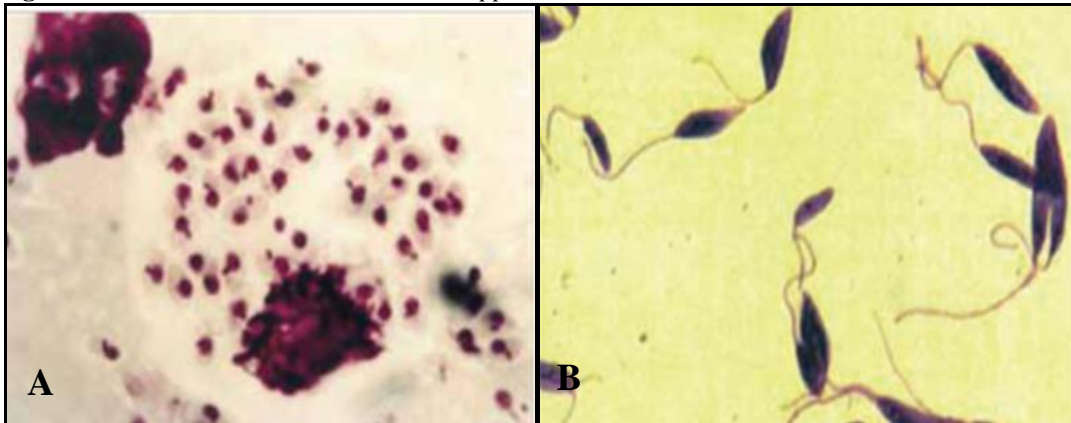
2.1 Aspectos gerais

As leishmanioses são enfermidades causadas por várias espécies do gênero *Leishmania*, que pertencem à ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae (MARZOCHI, 1992). Nas Américas, a leishmaniose humana apresenta duas formas clínicas: a Leishmaniose Visceral americana (LVA), que é causada por *Leishmania infantum* (LUKES et al., 2007; MAURÍCIO et al., 2000), e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), que é causada por várias espécies de *Leishmania* que parasitam principalmente células macrofágicas da pele (BASANO; CAMARGO, 2004).

A doença apresenta uma ampla variedade de agentes etiológicos, o que dificulta o controle nas populações humanas, associado à precariedade socioambiental. Devido a diferenças ecoepidemiológicas é importante à caracterização molecular e o estudo da adaptação destes parasitos em áreas endêmicas (LIMA, 2010). No Brasil, já foram verificadas sete espécies que causam doença no homem, sendo duas do subgênero *Leishmania* e cinco do subgênero *Viannia*, a saber: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (L.) infantum*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi* (LAINSON; SHAW, 1998).

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a espécie mais prevalente nas Américas, sendo no Brasil a única espécie que ocorre em todas as unidades federativas (BRASIL, 2007). Em Pernambuco, há evidências que esta seja a única espécie envolvida na transmissão da LTA com diversas variantes circulantes (BRITO et al., 2009).

O gênero *Leishmania* compreende protozoários parasitos, com um ciclo de vida digenético e único núcleo, sendo encontrados sob duas formas: amastigotas e promastigotas. As formas amastigotas apresentam morfologia ovalada e flagelo não exteriorizado, com multiplicação no interior dos macrófagos, sendo esta forma intracelular obrigatória do sistema fagocítico mononuclear (SFM) de hospedeiros vertebrados, enquanto que as promastigotas, que são as infectantes, são encontradas nos hospedeiros invertebrados, multiplicando-se por divisão binária dentro do tubo digestivo do inseto vetor. Possuem estrutura alongada e flagelo livre, o que permite sua mobilidade intercelular (Figura 1) (SIMPSON, 1987).

Figura1- Formas evolutivas de *Leishmania* spp.

Fonte: Brasil (2011)

Legenda-A: Forma amastigota da *Leishmania* spp.; B: Forma flagelada ou promastigota *Leishmania* spp.

A LTA se propaga através da infecção do parasito em vetores e reservatórios silvestres e sinantrópicos, sendo o homem um hospedeiro acidental (SILVA et al., 2005), cuja principal forma de transmissão é através da picada de fêmeas hematófagas de pequenos dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, dos gêneros *Phlebotomus*. No Velho Mundo os vetores são *Lutzomyia*, no Novo Mundo (KILLICK-KENDRICK, 1990), conhecidos genericamente como flebotomíneos (GONTIJO; MELO 2004), que ingerem os parasitos durante o repasto sanguíneo a partir de um reservatório vertebrado, quando infectado.

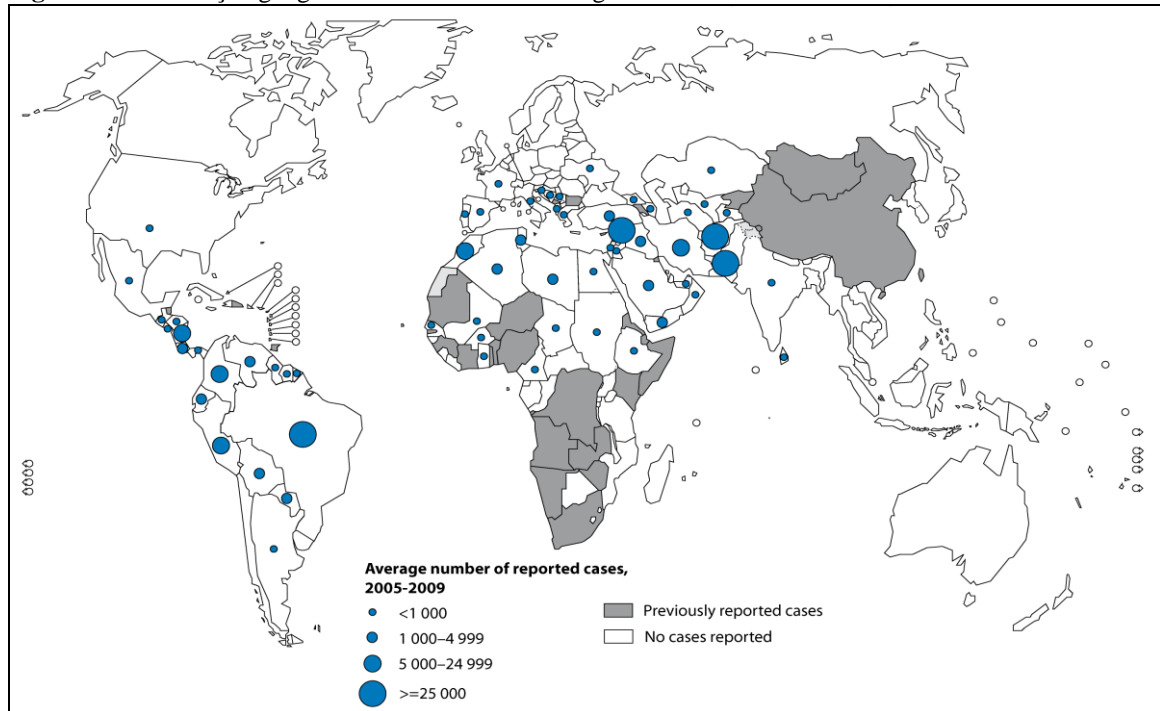
Várias espécies de flebotomíneos são descritas na transmissão da LTA no Brasil, ressaltando-se como principais transmissoras: *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia migonei*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia wellcomei*, e *Lutzomyia flaviscutellata* (RANGEL; LAINSON, 2003), além de registros de infecções naturais de outras espécies, como *Lutzomyia neivai* e *Lutzomyia fischeri* (PITA-PEREIRA et al., 2009; ROCHA et al., 2010). Em Pernambuco, 37 espécies já foram identificadas, e há predominância de *Lutzomyia whitmani* no intra e peridomicílio e *Lutzomyia complexa* em áreas de floresta remanescentes de focos de LTA (ANDRADE; DANTAS-TORRES, 2010; BRITO et al., 2012). Os reservatórios de LTA variam de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida na transmissão. Infecções por espécies de *Leishmania* foram descritas em animais silvestres, sinantrópicos e domésticos, como canídeos, felídeos e equídeos (MARINHO-JÚNIOR 2010).

2.2 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana

A LTA está incluída na lista de prioridades para a Organização Mundial de Saúde (OMS) e no seu programa especial de pesquisa e treinamento em doenças tropicais (TDR),

que recomendam que as pesquisas se concentrem na geração de novos conhecimentos e, sobretudo na aplicação de novas abordagens para seu controle (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010; REMME et al., 2002). Nas Américas, sua distribuição tem sido registrada em quase todos os países, do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina (Figura 2) (LAINSON, 1983).

Figura 2- Distribuição geográfica da Leishmaniose Tegumentar no mundo

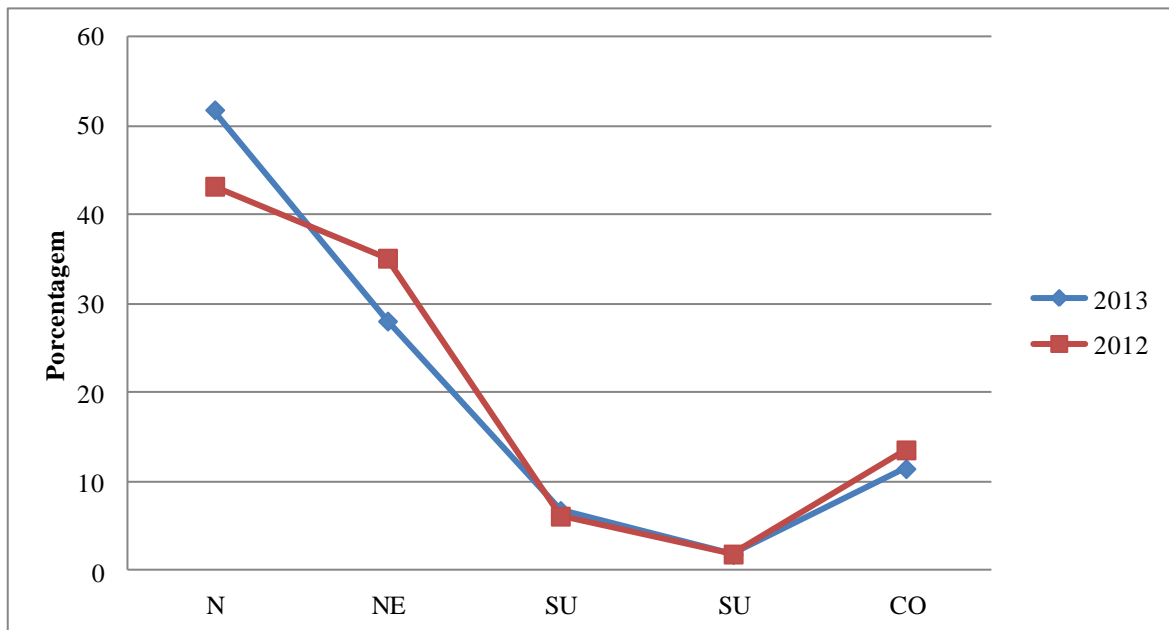


Fonte: Organização Mundial de Saúde (2010, tradução nossa).

Nota: Figura ilustrativa demonstrando a média de número de casos reportados no mundo entre 2005 e 2009. Em cinza casos previamente relatados e em branco não há casos relatados.

No Brasil, a LTA é um dos maiores problemas de saúde pública, devido sua ampla distribuição pelo território nacional, ocorrência de formas clínicas graves e dificuldades referentes tanto ao diagnóstico como ao tratamento (DORVAL et al., 2006). Cerca de 35.000 casos ocorrem a cada ano (BRASIL, 2010), sendo este número sempre ascendente em todas as unidades federativas, embora a subnotificação represente um problema constante nas áreas de transmissão da enfermidade, de 2004 a 2013 foram registrados 219.441 casos de LTA no país. Em 2013, na região Nordeste, o número de casos registrados é significativo, constituindo 28,08% do total notificado, sendo a segunda região com maior incidência no país (Figura 3) (BRASIL, 2014).

Figura 3. Distribuição de Leishmaniose Tegumentar Americana nas regiões do Brasil nos anos de 2012 e 2013.

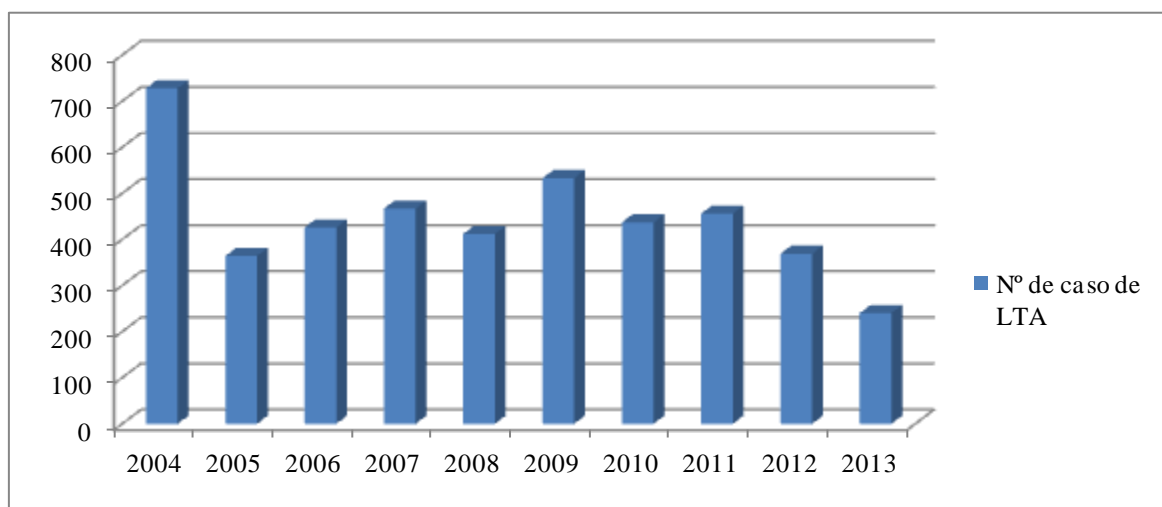


Fonte: Brasil (2014).

Legenda: N- Norte; NE- Nordeste; SU- Sudeste; S- Sul e CO- Centro oeste.

Em Pernambuco, a LTA incide em todas as regiões do Estado, com predominância na Zona da Mata, que concentra mais de 60% do total de casos notificados (BRANDÃO-FILHO et al., 1999, 2001). No ano de 2011 o número de casos registrados foi de 456, em 2012 esse número foi de 369 casos, em 2013 este número foi de 240, de demonstrando a importância da doença no estado de Pernambuco (Figura 4) (SISTEMA DE AGRAVOS E NOTIFICAÇÕES, 2014).

Figura 4- Distribuição dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana notificados em Pernambuco, durante o período de 2004 a 2013.



Fonte: Brasil (2014).

Do ponto de vista epidemiológico da LTA, são descritos alguns padrões de transmissão: silvestre, ocupacional, rural e periurbano. O padrão silvestre ocorre em áreas de vegetação primária e está relacionado, fundamentalmente, ao ambiente silvestre, onde acomete animais, podendo o homem ser infectado quando entra em contato com este ambiente. O padrão ocupacional está relacionado com a exploração desordenada da floresta, derrubada de matas e atividades de ecoturismo. Os processos migratórios, a ocupação de encostas, aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias ou residuais correspondem ao padrão rural e periurbano em áreas de colonização (BRASIL, 2007).

Nas últimas décadas, mudanças nos padrões de transmissão estão ocorrendo de acordo com análises epidemiológicas (BRASIL, 2007). A população rural é a principal acometida (BRACHO et al., 2007), sendo os indivíduos do sexo masculino na faixa etária jovens e adultos infectados em maior proporção por exposição ocupacional. Entretanto, a doença vem ganhando importância no contexto doméstico, afetando crescente número de mulheres e crianças (BRASIL, 2007; CINFUENTES et al., 2007).

2.3 Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

A interação entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro pode desencadear uma série de eventos responsáveis pela ocorrência de diferentes manifestações clínicas. Devido a esta complexidade, as formas clínicas da LTA têm permitido diversas classificações, e segundo Silveira et al. (2004) elas podem se manifestar como leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose recidivante (LR). Dados experimentais e observações epidemiológicas têm também enfatizado a importância do estado imunológico do hospedeiro sobre as infecções, deixando claro que os desfechos das leishmanioses têm origens multifatoriais complexas (SCHRIEFER et al., 2005).

2.3.1 Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)

Dependendo da espécie de *Leishmania* ela pode se apresentar das diferentes formas:

Leishmania (Viannia) braziliensis- é a espécie presente em todas as regiões do Brasil e causa lesões conhecidas como úlcera de Bauru, lesões únicas ou em pequeno número, em forma de cratera, que tendem a cura espontânea. Seu curso é irregular e crônico; esta forma é

a responsável pela forma cutânea mais destrutiva (ANDRADE et al.,1999; JONES et al., 1987; TALHARAI et al., 1998)

Leishmania (Viannia) guyanensis- esta espécie está prevalente na Bacia Amazônica e é prevalente nos estados do Amazonas e Acre. Apresenta-se geralmente sobre a forma de úlcera única tipo “cratera de lua” e dissemina-se pelo corpo (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MILES et al.,1981;SILVEIRA et al.,2004).

Leishmania (Leishmania) amazonensis- espécie identificada em várias regiões do Brasil, não é um parasito comum do homem, devido aos hábitos noturnos do vetor. Provoca lesões ulceradas e simples (BARRAL et al.,1991, 1993; MILES et al.,1981. TALHARAI et al., 1998) .

Em geral a LCL é caracterizada pela formação de úlceras únicas ou múltiplas confinadas na derme, com epiderme ulcerada. Uma variação da leishmaniose cutânea localizada é a forma disseminada e geralmente está relacionada com pacientes imunocomprometidos (BRASIL, 2007; COSTA et al.,2009; NEVES, 2005).

2.3.2 Leishmaniose Cutâneo-Mucosa (LCM)

Estima-se que de 2% a 5% dos casos de lesões cutâneas desenvolvam lesão mucosa. Um dos aspectos mais típicos da doença causada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis* são lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores (ALMEIDA et al.,1995; MARDSEN et al.,1986; 1994). A forma clássica é secundária à lesão cutânea. Acredita-se que a lesão mucosa metastática ocorra por disseminação hematogênica ou linfática. Geralmente, surge após a cura clínica da lesão cutânea, com início insidioso e pouca sintomatologia. Na maioria dos casos, a doença resulta de lesão cutânea de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado. Pacientes com lesões cutâneas múltiplas, lesões extensas e com mais de um ano de evolução, localizadas acima da cintura, são o grupo com maior risco de desenvolver metástases para a mucosa (MARDSEN et al.,1986, 1994; RIBEIRO; LOPES, 1994). A espécie *Leishmania guayanensis* também pode provocar lesões cutaneomucosas, embora sejam raros os casos relatados na Amazônia (BRASIL, 2007; NEVES, 2005).

2.3.3 Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)

Esta forma clínica é provocada por parasitos do complexo mexicana, cujo agente etiológico é *Leishmania pifanoi*, na Venezuela, e *Leishmania amazonensis*, no Brasil. A LCD constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* (BRASIL, 2007; NEVES, 2005). Inicia de maneira insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento; evolui de forma lenta, com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões cutâneas. A resposta à terapêutica é pobre ou ausente e geralmente a Intradermoreação de Montenegro (IDRM) apresenta-se negativa. O diagnóstico diferencial com outras doenças sempre deve ser considerado, principalmente com: sífilis, hanseníase, tuberculose, paracoccidioidomicose, histoplasmose, lobomicose e esporotricose (BRYCESON, 1969; CONVIT et al.,1962; MORIEARTY, 1978)

2.3.4 Leishmaniose Recidivante (LR)

Caracteriza-se por evoluir com cicatrização espontânea ou medicamentosa da ulcera, com reativação localizada geralmente na borda da lesão. A resposta terapêutica é pobre ou ausente e geralmente a IDRM apresenta-se positiva. Lesões apresentando cicatrização central com bordas infiltradas em algumas áreas e lesões satélites ao redor (BRASIL, 2007; CONVIT et al.,1962; NEVES, 2005).

No Novo Mundo, enquanto existem cepas que induzem alterações cutâneas não complicadas, há outras que são capazes de induzir lesões evolutivas, disseminando-se por todo o corpo ou comprometer secundariamente a região nasofaríngea. Portanto, a identificação parasitária é importante para a abordagem terapêutica, envolvendo esquemas específicos e o acompanhamento do doente (CORVALAN et al, 2011).

Figura 5- Formas Clínicas de Leishmaniose Tegumentar Americana

Fonte: Neves (2005).

Legenda- A: Caso de LCL; B: Caso de LCM; C: Caso de LCD e D: Caso de LR

2.4 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana

O diagnóstico da leishmaniose deve ser feito a partir de um conjunto de critérios (KAR, 1995): (a) manifestações clínicas associadas à procedência de uma área endêmica; (b) exames parasitológicos, onde se incluem a pesquisa microscópica do parasito, o cultivo *in vitro* e/ou *in vivo* e o exame histopatológico; (c) imunodiagnóstico; (d) diagnósticos moleculares, onde há detecção do DNA do parasito; (e) testes terapêuticos (RODRIGUES, 2000).

2.4.1 Diagnóstico clínico-epidemiológico

O diagnóstico clínico nem sempre se dá de forma simples e imediata, devido não somente as diversas formas clínicas da LTA, mas também por apresentarem similaridade com outras patologias, entre elas furúnculos, piodermites, paracoccidioidomicose, esporotricose, lúpus vulgaris, sífilis, tuberculose cutânea, entre outras (GONTIJO; CARVALHO, 2003). A partir dessas características faz-se necessária a associação de dados epidemiológicos e da demonstração do parasito em exames laboratoriais.

O diagnóstico clínico-epidemiológico deve ser realizado com base nas características das lesões cutâneas e também na mucosa nasal e/ou oral, associadas à anamnese, onde os dados epidemiológicos são de grande importância. O diagnóstico clínico da LTA pode ser difícil, pois os sinais e sintomas podem ser confundidos com outras doenças ou afecções que podem acometer a pele e também a mucosa (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

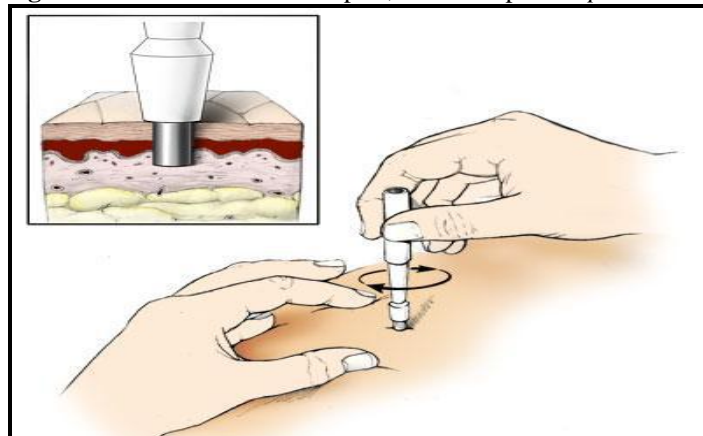
Portanto, torna-se importante a adoção de critérios diferenciais para o diagnóstico com outras doenças, tais como: impetigo causado por bactérias, ectima, cromoblastomicose, úlceras/traumáticas e de estase, paracococidioidomicose, hanseníase, sífilis terciária e rinosporidiose (BRACHO et al., 2007; COSTA et al., 2009; SING, 2006).

Quanto ao inquérito epidemiológico, as informações sobre a procedência do paciente, envolvimento com atividades ocupacionais como a agricultura ou atividades de lazer na floresta são cruciais para o diagnóstico da LTA (BRASIL, 2010).

2.4.2 Métodos de coleta e substratos utilizados para o diagnóstico

Os principais procedimentos utilizados para o diagnóstico da LTA são escarificação, biópsia cutânea e punção aspirativa. A primeira é realizada na borda interna da úlcera ou da superfície de lesão fechada, utilizando-se lâminas de bisturi estéreis ou estilete, a punção aspirativa é realizada após injeção de solução salina estéril na borda da lesão ou linfonodo, utilizando-se uma seringa. A biópsia cutânea é realizada com o uso de lâmina de bisturi, ou com o auxílio de *punch*, e pode ser utilizada para confecção de esfregaço em lâmina, cortes histológicos, inoculações em animais ou em meios de cultura, e ainda em técnicas moleculares (Figura 6). Para os exames imunológicos e sorológicos é utilizado o sangue, que também é destinado ao desenvolvimento de testes moleculares (BRASIL, 2007).

Figura 6 - Procedimento de biópsia, auxiliado por um *punch*



Fonte: Wheeland (1994).

O modelo de obtenção dos materiais para análise diagnóstica apresentam cuidados cruciais ao paciente, haja vista tratar de processos invasivos, passível de inflamação, infecção por outros organismos, podendo haver reativação da doença, em alguns casos.

A busca por métodos de coleta de material biológico, que sejam mais práticos e menos invasivos e agressivos vem crescendo nos últimos anos. A utilização de *swab* bacteriológico tem sido relatada na literatura como material de coleta não invasivo para o diagnóstico de alguns doenças como tuberculose (SALEM et al., 2007), coqueluche (ALMEIDA et al., 2011) e leishmaniose visceral canina, a partir da coleta de material da conjuntiva ocular dos animais e posterior análise molecular por PCR (FERREIRA et al., 2008; LEITE et al., 2011). Em se tratando de Leishmaniose Tegumentar, Mimori et al. colaboradores (2002) e Araújo (2013) obtiveram sucesso no diagnóstico ao coletar amostras utilizando *swab* combinados à técnica de PCR, confirmando a eficiência do método.

O avanço das técnicas moleculares tem permitido o uso de diversos substratos para fins de diagnóstico. Por exemplo, a saliva tem sido utilizada por ser uma amostra de fácil obtenção, de baixo custo e risco de contaminação, cuja coleta é um procedimento simples e, principalmente, não invasivo (KAUFMA; LAMSTER, 2002). Corvalan et al. (2011) utilizaram amostras de saliva para detecção de *Leishmania (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* em quatro pacientes com lesões mucocutâneas. Apesar do número limitado de pacientes, os resultados do referido estudo sugerem o potencial uso da saliva como amostra para o diagnóstico da LTA por *L. (V.) braziliensis*. Por outro lado, o substrato salivar abre as portas para uma investigação sobre a possível permanência do parasito numa região, ainda não abordada como centro de detecção diagnóstica.

2.4.3 Diagnóstico Laboratorial

Os métodos laboratoriais aplicados rotineiramente para o diagnóstico da LTA variam de paciente para paciente, além de apresentarem sensibilidade variável (FERREIRA et al., 2006). Devido à escassez dos protozoários, que geralmente estão presentes nas amostras clínicas, a confirmação diagnóstica nem sempre é possível (LOUREIRO et al., 1998).

Têm-se observado nas últimas décadas um grande progresso no desenvolvimento de técnicas úteis para o diagnóstico e estudos epidemiológicos (BAÑULS, HIDE; TIBAYRENC, 1999). A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com sua elevada sensibilidade, oferece alternativas para estudos clínicos e epidemiológicos em leishmanioses (DE BRUIJN;

BARKER, 1992; RODRIGUES et al., 2002), inclusive em estudos genotípicos (RODRIGUES et al., 2013).

2.4.3.1 Diagnóstico parasitológico

O atual método de rotina, onde tradicionalmente se define o diagnóstico, é a demonstração do parasito em amostras biológicas. A pesquisa direta é o exame mais simples e de baixo custo, onde é possível a visualização de formas amastigotas ao microscópio óptico (CUBA CUBA et al., 1981). A identificação de *Leishmania* spp. por este método é rápida e fácil, entretanto não discrimina espécies e sua sensibilidade, é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão, e varia entre 60% e 65% (SINGH, 2006).

A histopatologia é empregada na pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp., porém é muito mais útil para o diagnóstico diferencial, pois é utilizado rotineiramente como técnica diagnóstica para o estudo de processo ulcerativo desconhecido, estabelecendo, assim, outras etiologias (WEIGLE et al., 1987). A sensibilidade dos exames histopatológicos é baixa devido à escassez de parasitos, por isso é indicativa, mas raramente específica o suficiente para poder fazer a confirmação, que só pode ser feita mediante achado dos parasitos (GONTIJO; CARVALHO, 2003; LOUREIRO et al., 1998).

Além dos métodos citados pode ser feito o cultivo do parasito *in vivo* ou *in vitro*, inoculando o material obtido em animais susceptíveis como o hamster (*Mesocricetus auratus*) ou em meio de cultura, respectivamente (BRASIL, 2003; GONTIJO; CARVALHO, 2003). O meio mais empregado para o isolamento *in vitro* de *Leishmania*, a partir de pacientes com lesões características, é o ágar sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle (NNN modificado) (GONTIJO; CARVALHO, 2003; NAVIN et al., 1990). Por outro lado, o desenvolvimento parasitário na cultura *in vivo* apresenta-se mais lento para iniciar a infecção no animal (BRUJIN et al., 1993; UEZATO et al., 1998).

2.4.3.2 Imunodiagnóstico

O diagnóstico imunológico pode ser feito por teste cutâneo através da Intradermorreação de Montenegro (IDRM) que traduz a resposta de hipersensibilidade celular retardada, por sorologia pela reação de imunofluorescência indireta (IFI) e testes imunoenzimáticos “enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA), que expressam os níveis de anticorpos circulantes (BRASIL, 2007; GONTIJO ; CARVALHO, 2003).

A IDRM é empregada amplamente como método diagnóstico de rotina na confirmação de doença ativa, no diagnóstico retrospectivo e em inquéritos epidemiológicos (MAGALHÃES et al., 1986). Este exame consiste tecnicamente na inoculação de 0,1 mL de cultura de *Leishmania* (antígeno padronizado) na face anterior do antebraço direito ou esquerdo com leitura após 48 horas, (MELLO et al., 1997). O método apresenta limitações especialmente na interpretação de seus resultados que não diferencia doença atual de recidiva, visto que em indivíduos que já foram diagnosticados com LTA e tratados este teste pode permanecer positivo ao longo da vida, assim como em indivíduos assintomáticos, moradores de áreas endêmicas com exposição ao parasito (LOPEZ et al., 1993).

As reações sorológicas de imunofluorescência indireta (IFI) e o teste imunoenzimático (ELISA) são de utilidade no diagnóstico de forma clínica de lesões extensas, múltiplas e nas lesões mucosas primárias e secundárias (MENDONÇA et al., 1988). No entanto, apresentam baixos níveis de anticorpos circulantes (BRYCESON, 1970) e reações cruzadas com leishmaniose visceral e doença de Chagas, causadas por organismos próximos filogeneticamente.

2.4.3.3 Diagnóstico molecular

A reação em cadeia da polimerase (PCR) está entre as mais avançadas técnicas de biologia molecular que tem evoluído consideravelmente nos últimos anos. É um teste de base molecular utilizado na identificação de gênero e espécie de *Leishmania* (YANG; ROTHMAN, 2004), além de estudos sobre diversidade genética e evolução parasitária. O diagnóstico molecular torna-se útil em casos de baixa carga parasitária e monitoração de terapias, contribuindo, desta forma, para o avanço da epidemiologia molecular de doenças infecto-parasitárias (REITHINGER et al., 2007; ROSELINO, 2008).

Esta técnica molecular permite a amplificação de segmentos específicos de DNA a partir de oligonucleotídeos iniciadores anelados especificamente nas margens da região alvo. A reação é dependente da enzima *Taq* polimerase e se realiza ao longo de vários ciclos, consistindo tipicamente de desnaturação do DNA, anelamento (hibridização) dos oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* às sequências alvos complementares e extensão (DE BRUIJN; BARKER, 1992).

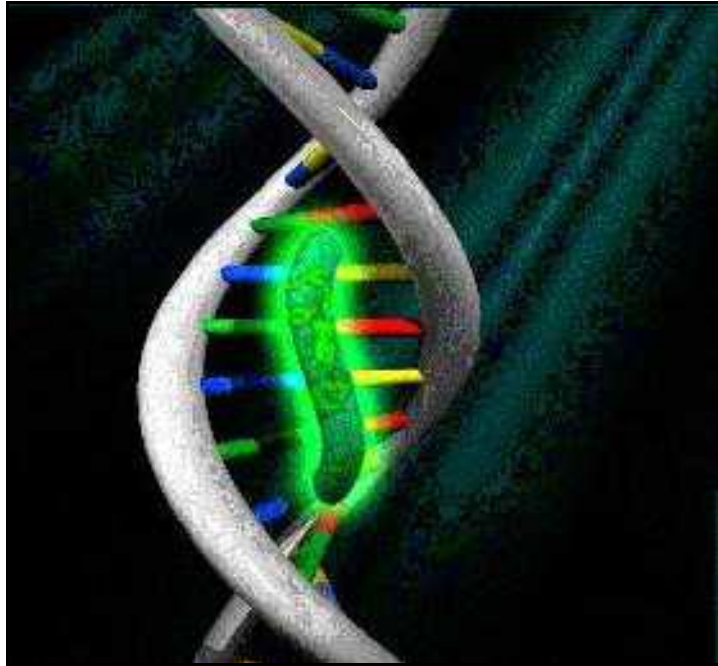
Além da grande sensibilidade diagnóstica da PCR, outras vantagens deste método são a rapidez com que pode ser realizado e a variedade de amostras que podem ser utilizadas para análise, que no caso da LTA, podem ser biópsia congelada ou fresca, amostras fixadas

em formol ou etanol, incluídas em blocos de parafina, aspirado de linfonodos, baço, medula óssea, saliva e sangue periférico (COSTA et al, 2009; REITHINGER et al., 2000;UEZATO et al., 1998).

Para a LTA esse método apresenta grande valor diagnóstico devido à sua capacidade de detectar resultados positivos em lesões, onde há escassez de parasitos. Essa vantagem é superior aos outros métodos parasitológicos convencionais. Além disso, técnicas que utilizam o isolamento de parasitos em cultura e inoculação em animais de laboratório requer infraestrutura especializada, encontradas basicamente em centros de referência. Todavia, os métodos convencionais são laboriosos, onerosos e poucos sensíveis para boa parte das lesões observadas em pacientes (LOPEZ et al.,1993; WEIGLE et al., 2002).

A PCR convencional apresenta algumas variações, como a RT-PCR (reverse transcriptase-PCR) que polimeriza o RNA mensageiro (mRNA) maduro realizando uma transcrição inversa em DNA complementar (cDNA), através da enzima transcriptase reversa (NICOLAS et al., 2002). É possível também a utilização, em uma mesma reação, com mais de um par de *primers*, ocasionando a amplificação de múltiplas sequências de um determinado alvo de DNA, caracterizando a multiplex-PCR (BEJ et al.,1990; CHAMBERLAIN et al.,1988; GEHA et al.,1994; REA et al.,2001). A nested-PCR é uma outra variação da PCR convencional que utiliza para a amplificação do alvo desejado dois pares de oligonucleotídeos iniciadores ou *primers*, em duas reações distintas, no caso ocorre uma reamplificação de uma região interna ao alvo, aumentando assim a sensibilidade e especificidade da técnica (TAO et al., 2004).

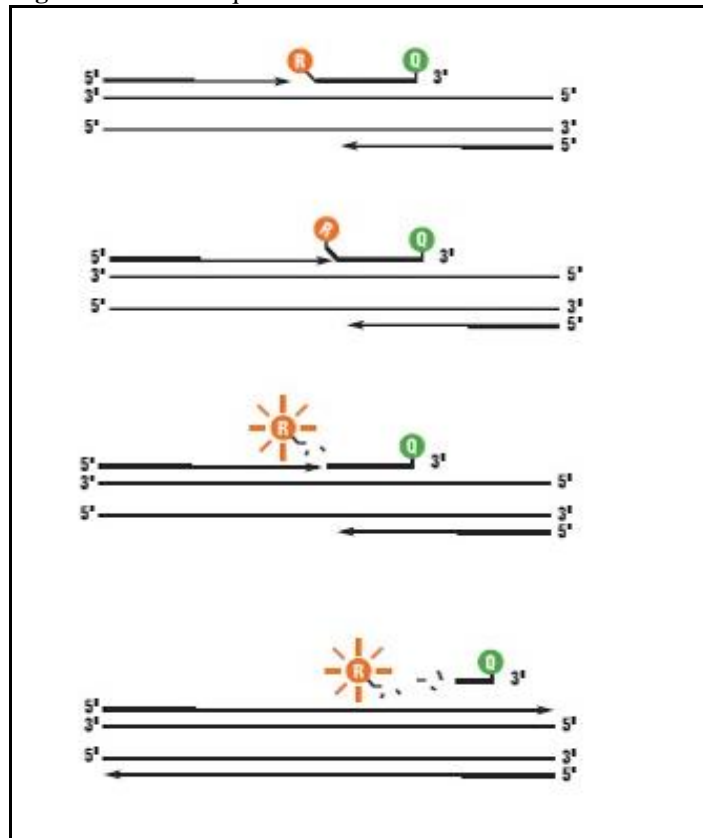
Um importante avanço tecnológico no diagnóstico das doenças infecto parasitárias é representado pela PCR em tempo real (qPCR), outra variação da PCR convencional (CAVALCANTI et al.,2008; HOLLAND et al.,1991; PAIVA-CAVALCANTI, 2008). Esta técnica é baseada no uso de sondas ou corantes fluorescentes, que permitem a monitoração em tempo real da amplificação do alvo desejado. O SYBER GREEN é um dos corantes mais utilizados, ele se liga de forma inespecífica a fitas duplas de DNA, formadas durante a amplificação. No momento que se liga a molécula de DNA a cianina (substância presente no corante) emite fluorescência (Figura 7).

Figura 7- Corante SYBR GREEN

Fonte: Paiva-Cavalcanti (2008).

Legenda: Corante SYBR Green I intercalando uma fita dupla de DNA formada durante a reação de PCR em tempo real.

Em relação as sondas, a TaqMan[®] é dirigida especificamente a uma região interna da sequência alvo. Durante a amplificação a extremidade 5' da sonda (contendo o *reporter*) é deslocado pela *Taq* polimerase, fazendo com que seja emitida fluorescência, já que o *reporter* é liberado e não permanece próximo ao *quencher* (MONTORINO et al.,2004, YANG, ROTHMAN, 2004) (Figura 8). A fluorescência emitida é captada por um detector de sinal luminoso e um amplificador de sinal e a cada ciclo da PCR é traçado um gráfico com a absorção obtida, a quantidade de produto formado é proporcional a intensidade do sinal gerado (KUBISTA et al., 2006).

Figura 8- Sonda TaqMan®

Fonte: Adaptado de Applied Biosystems® (2015).

Legenda: Sonda TaqMan® sendo degradada e emitindo fluorescência após a adição de nucleotídeos por ação da Taq polimerase durante a reação de PCR em tempo real.

Nota: R: *reporter*; Q: *quencher*.

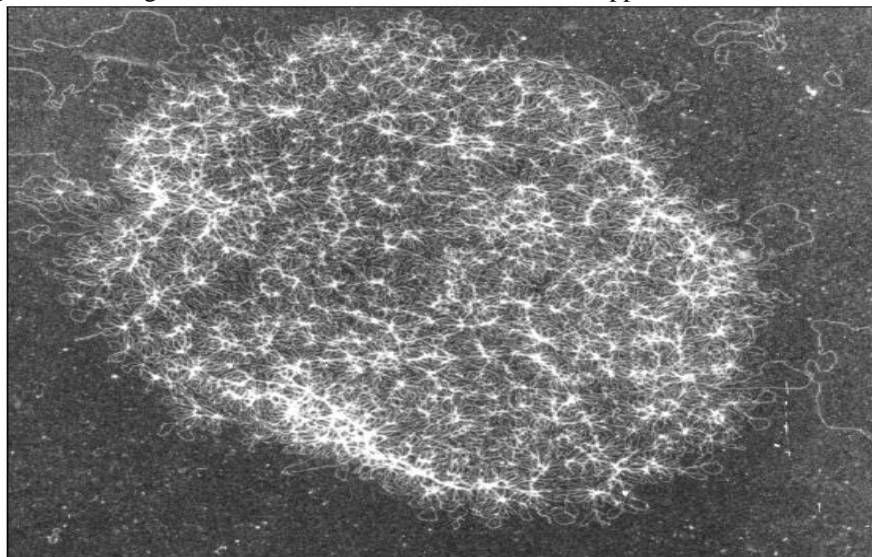
A análise dos resultados de um ensaio de qPCR é feita por meio dos gráficos gerados no computador interligado ao termociclador através de quatro análises: 1) Curva de amplificação, 2) Curva de dissociação, 3) Espectro e 4) Componente (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

Em se tratando da leishmaniose esta técnica tem sido utilizada na realização de estudos relacionados à carga parasitária, à interação hospedeiro-parasito e ao monitoramento da terapia em cães e pacientes humanos no diagnóstico da LV (FRANCINO et al., 2006; MARY et al., 2004; MORTARINO et al., 2004; NICOLAS et al., 2002; ROLÃO et al., 2004; ROURA; SANCHEZ; FERRER, 1999; VITALE et al., 2004; WORTMANN et al., 2004). Em 2013, Paiva et al. detectaram, através da qPCR em tempo real, *Leishmania (Viannia) braziliensis* em amostras de sangue de cães, representando uma nova ferramenta para a identificação específica, associações hospedeiro-parasito e dinâmica da infecção no hospedeiro e populações de vetores.

Um dos caminhos para estudos em biologia molecular de tripanosomatídeos é o genoma mitocondrial, onde concentram-se estruturas apropriadas para análises nucleotídicas. A estrutura característica do kDNA permite sua utilização em diagnóstico molecular, genotipagem, além de estudos taxonômicos (RODRIGUES, 2006, RODRIGUES et al., 2013). O kDNA de *Leishmania* spp. é constituído de dois componentes: os maxicírculos e os minicírculos (Figura 9) (STUART, 1983; SIMPSON, 1987). Os maxicírculos têm 20-40 kb, estão presentes em 30-50 cópias e representam genes codificando enzimas mitocondriais. Os minicírculos têm aproximadamente 850 pb e estão presentes em cerca de 10.000 cópias/célula (BARKER et al., 1983; SIMPSON, 1987). Existe uma região de aproximadamente 200 pb nos minicírculos que é conservada, enquanto que a região restante é considerada variável, sendo heterogênea mesmo entre cepas de uma mesma espécie (FERNANDES et al., 1999). Essas características são utilizadas em diagnóstico molecular por PCR e hibridização utilizando sondas moleculares (BARKER; BUTCHER, 1983; GRAMICCIA et al., 1992; RODRIGUES et al., 2002).

Estudos abordam a detecção do DNA de *Leishmania* em diferentes amostras clínicas de pacientes com leishmaniose (LASKAY et al., 1995; MOMENI et al., 1996; RAVEL et al., 1995; SMYTH et al., 1992). Portanto, a amplificação por PCR deste alvo mitocondrial, presente em múltiplas cópias permite a detecção de infecção por *Leishmania* spp. com alta sensibilidade.

Figura 9- Micrografia eletrônica do kDNA de *Leishmania* spp.



Fonte: Barker (1989).

Legenda: kDNA de *Leishmania* sp composto por uma rede compacta de maxicírculos e minicírculos. Os maxicírculos podem ser visualizados na periferia da rede do kDNA.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a identificação de *Leishmania (Viannia)* spp. em amostras de saliva, coletadas com *swab*, a partir da técnica de PCR em tempo real.

3.2 Específicos

- a) Avaliar o limite de detecção do DNA de *Leishmania* a partir da PCR convencional e PCR em tempo real;
- b) Avaliar a viabilidade de detecção de *Leishmania (Viannia)* spp. por cPCR e qPCR em fluido salivar, utilizando *swab* como método de coleta em pacientes com LTA;
- c) Comparar o desempenho entre substratos (biópsia e saliva) no diagnóstico molecular da LTA;
- d) Comparar o diagnóstico parasitológico da LTA, através da pesquisa direta, com o diagnóstico molecular, por qPCR;
- e) Comparar o diagnóstico molecular da LTA, através da cPCR e qPCR em amostras de saliva, coletadas a partir de *swab*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental

Foi realizado um estudo descritivo, tipo série de casos, como forma de avaliar o substrato salivar humano coletado com *swab*, sendo estes essenciais para o desenvolvimento do diagnóstico molecular da LTA, em regiões endêmicas do estado de Pernambuco.

Com o intuito de comparar o desempenho do método de coleta proposto com o método de rotina, em cada paciente selecionado realizou-se a coleta de três amostras paralelamente: saliva através do *swab* e biópsia, para o diagnóstico molecular; e escarificação da lesão para a pesquisa direta de amastigotas (Figura 10).

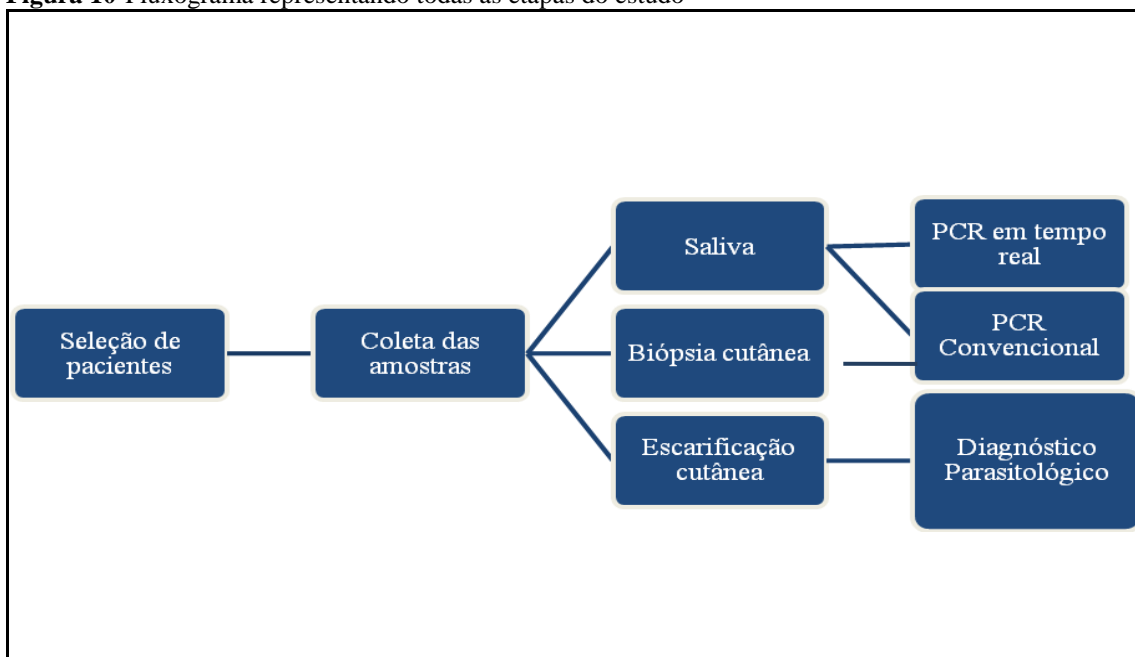
Os casos de LTA incluídos no estudo basearam-se em um conjunto de critérios:

1) Presença de lesões tegumentares típicas e antecedentes epidemiológicos compatíveis.

2) Presença adicional de positividade em pelo menos um dos testes diagnósticos seguintes: pesquisa direta do protozoário na lesão e exame molecular através de biópsia.

Os casos de LTA excluídos do estudo foram os pacientes portadores de lesões cutâneas mucosas.

Figura 10-Fluxograma representando todas as etapas do estudo



Fonte: A Autora

4.2 Aspectos éticos

Este trabalho apresenta parecer do comitê de ética que norteia pesquisas com seres humanos do CPqAM/FIOCRUZ (nº 44/2011) e cada indivíduo participante foi informado sobre a natureza do estudo, assinando um Termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE.

4.3 Seleção de pacientes

Os pacientes suspeitos de apresentarem LTA foram atendidos no Serviço de Dermatologia do Hospital Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco – UPE, e selecionados desde janeiro a dezembro de 2014, seguindo a rotina ambulatorial quinzenalmente. Os pacientes incluídos no estudo eram provenientes de áreas endêmicas de Pernambuco, a maioria pertencente a região de Zona da Mata do estado, onde se concentram áreas de florestas secundárias.

O diagnóstico clínico foi realizado pelo profissional médico através da anamnese, e baseou-se nas características da lesão associada aos dados epidemiológicos do paciente (procedência, faixa etária, ocupação e localização de residência).

4.3.1 Critérios de inclusão e exclusão do estudo

Ao todo foram selecionados 64 pacientes, que atenderam ao critério 1, descrito no item 4.1. Ao fazer as análises laboratoriais foram excluídos 24 pacientes, que não atenderam ao critério 2, descrito no item 4.1.

Portanto, a população estudada foi de 40 pacientes constituída de 65% de indivíduos do sexo masculino (n=26) e de 35% do sexo feminino (n=14), com idade média de 34,6 anos. A faixa etária variou de 0-15 anos (13,3%), 16-29 anos (40%), 30-59 anos (35,5%) e acima de 60 anos (12,5%). Dos indivíduos portadores de LTA incluídos no estudo 42,5% foram constituídos de trabalhadores rurais, sendo provavelmente infectados por exposição ocupacional. Os membros inferiores foi o local mais acometido por lesões, perfazendo 55% (22/40) (Tabela 1).

Tabela 1- Características epidemiológicas da população selecionada durante o estudo

Características	População estudada	%
Faixa etária (anos)		
0-15	7	17,5
16-29	12	30
30-59	16	40
Acima de 60	5	12,5
Sexo		
Masculino	26	65
Feminino	14	35
Ocupação		
Agricultor	17	42,5
Estudante	9	22,5
Doméstica	7	17,5
Outros	7	17,5
Local das lesões		
Membros inferiores	22	55
Membros superiores	8	20
Membros superiores e inferiores	4	10
Outros	6	15
TOTAL	40	100

Fonte: A autora

4.4 Coleta de amostras

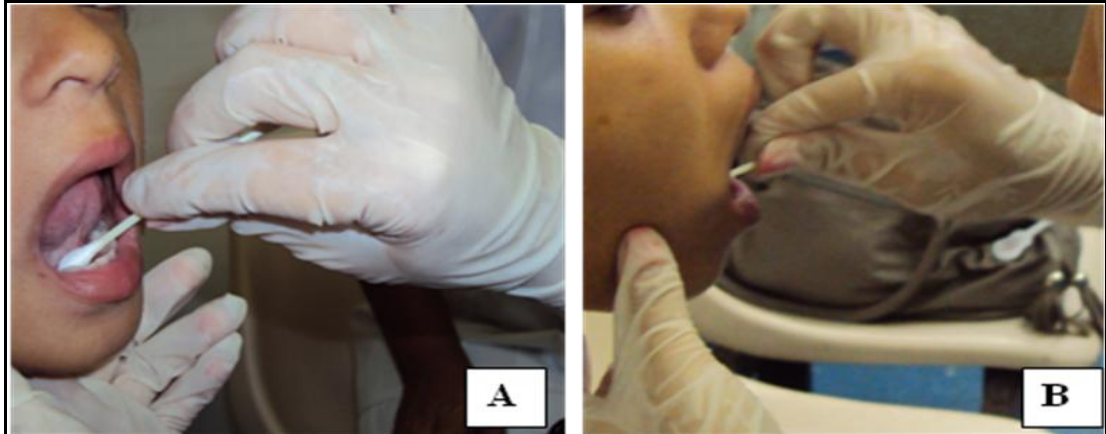
As biópsias cutâneas foram realizadas com auxílio de *punch* de 5 mm de diâmetro, na borda da lesão, após antissepsia com álcool iodado a 0,01% e infiltração anestésica local com cloridrato de prilocaína a 3% e felipressina (Figura 11).

Figura 11- Coleta de biópsia cutânea

Fonte: A autora

Os fluidos salivares foram coletados com o auxílio de *swabs* bacteriológicos em condições estéreis. Inicialmente os pacientes foram estimulados para a produção de saliva e então, cuidadosamente, o *swab* foi movimentado de maneira circular em toda região da boca, principalmente na região do hipoglossos (abaixo da língua) e da mucosa oral (Figura 12).

Figura 12- Coleta da amostra de saliva através de *swab*

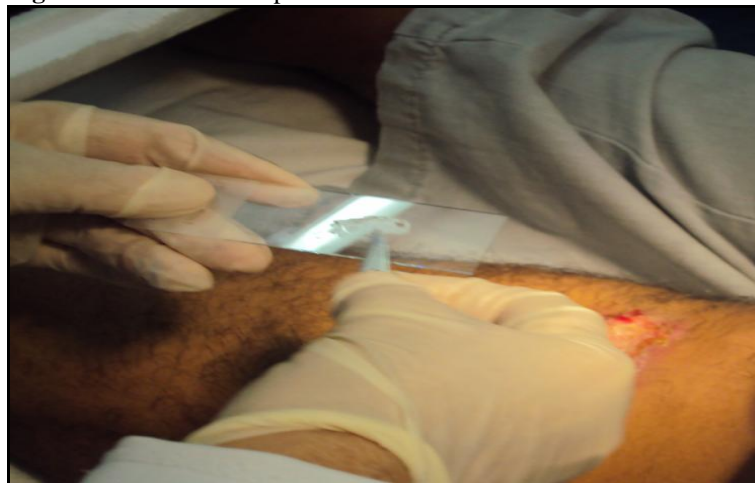


Fonte: A autora.

Legenda: A- Coleta de *swab* salivar da região do hipoglossos; B- Coleta de *swab* salivar da região da mucosa bucal.

As biópsias e os *swabs* embebidos foram estocados individualmente em tubos de 1,5 mL e transportados para o Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM, onde permaneceram estocados a -70°C e -4°C , respectivamente, até sua utilização. Além disso, foi realizada raspagem com lâmina de bisturi estéril na borda da lesão, com o material coletado fixado e corado em lâmina de microscopia (Figura 13).

Figura 13- Coleta de raspado da lesão



Fonte: A autora

4.5 Diagnóstico Parasitológico

A técnica realizada para o diagnóstico parasitológico foi a pesquisa direta do parasito em lâmina. Os esfregaços confeccionados em lâminas de microscopia com o material da raspagem foram fixados com álcool metílico e corados pelo Giemsa. O exame de pesquisa direta foi realizado através de microscopia óptica (MO), objetiva 100x utilizando óleo de imersão para a pesquisa da forma amastigota de *Leishmania* spp.

4.6 Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular foi realizado através de extração e purificação das amostras, seguida pela PCR convencional e PCR quantitativa em tempo real e análises dos produtos de PCR, por eletroforese em gel de agarose e *softwares* ABI PRISM 7500 SDS (versão 1.4) respectivamente.

4.6.1 Extração e purificação de DNA

O DNA genômico presente nos *swabs* foi extraído e purificado através do kit QIamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, USA), seguindo as instruções do fornecedor.

As amostras devidamente purificadas foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific[®], modelo 2000c) para aferição do grau de pureza e concentração do DNA genômico adequados ao método de PCR.

4.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A partir da reação em cadeia da polimerase foi possível detectar o limite de detecção tanto da PCR convencional (cPCR) quanto da PCR em tempo real (qPCR), além da amplificação de determinados alvos moleculares e identificação do parasito.

4.6.2.1 Limite de detecção dos métodos moleculares

Foi realizado um experimento em condições determinadas por De Bruijn e Barker (1992) para avaliar desempenho do sistema LEIB1 e LEIB2 em amostras de *Leishmania*. Este experimento foi composto por amostras contendo DNA genômico de *L. braziliensis* oriundos da cepa de referência (IOC-L-566-MHOM/BR/75/M2903) nas quantidades de 10 ng/μL, 1 ng/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL, 10 fg/μL e 1 fg/μL e controles negativos (sem DNA).

Outro experimento foi realizado em condições determinadas por Paiva-Cavalcanti (2013) para avaliar o sistema do kDNA 1 em amostras de *Leishmania*. Este experimento foi composto por amostras contendo DNA genômico de *L. braziliensis* oriundos da cepa de referência (IOC-L-566-MHOM/BR/75/M2903) nas quantidades de 10 ng/μL, 1 ng/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL, 10 fg/μL e 1 fg/μL, e controles negativos (sem DNA).

4.6.2.2 PCR Convencional (cPCR)

O DNA genômico purificado foi submetido à amplificação por PCR utilizando um termociclador automático (Eppendorf[®], modelo Master Cycler gradient), que permite a amplificação do kDNA do parasito pertencentes ao subgênero *Viannia*. Para tanto, são utilizados os oligonucleotídeos iniciadores: LEIB1 (5'-GGGGTTGGTGTAATATAGTGG-3') e LEIB2 (5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3'), tendo como alvo de detecção todo minicírculo do kDNA de *Leishmania (Viannia) spp.*, equivalente a 750 pares de base, de acordo com as condições descritas por DE BRUIJN ; BARKER (1992). O oligonucleotídeo iniciador B1 é específico para cinetoplastídeos (hibridiza na possível origem de replicação), enquanto que o oligonucleotídeo iniciador B2 é específico para o subgênero *Viannia*.

A mistura de PCR consiste em 23μL de uma solução contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, MgCl₂ 1.5 mM, gelatina 0.01%, 0.2 mM de cada dNTP, 100 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador (DE BRUIJN ; BARKER, 1992) e 0.5 U de *Taq* DNA polimerase. A essa mistura foram adicionados 2μL de cada amostra de DNA. A PCR foi realizada em 35 ciclos (94 °C, 1 min; 65 °C, 1 min; 72 °C, 1 min) (ERESH, McCALLUM ; BARKER, 1994), precedidos de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C. Além disso, um controle negativo (sem DNA) foi adicionado à reação, juntamente com dois controles positivos (1 ng e 100 fg) de DNA genômico de *Leishmania (Viannia) braziliensis* oriundos da cepa de referência (IOC-L-566-MHOM/BR/75/M2903).

Após amplificação, 10μL do produto de PCR convencional foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1mM) corados por solução de brometo de etídio 10 μg/mL (SAMBROOK et al, 1989). São visualizadas as bandas de DNA separadas por eletroforese em um transiluminador de luz ultravioleta e digitalizadas através de um sistema de documentação Kodak[®], modelo Gel Logic 100 Imagem System.

4.6.2.3 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A amplificação do DNA devidamente extraído e purificado foi realizada no aparelho ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, CA, USA), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para kDNA, em condições determinadas por Paiva-Cavalcanti et al. (2013).

O experimento foi composto por amostras contendo controle negativo (sem DNA) adicionado à reação, juntamente com controles positivos (100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg e 1 fg) de DNA genômico de *Leishmania (Viannia) braziliensis* oriundos da cepa de referência (IOC-L-566-MHOM/BR/75/M2903), além das amostras dos pacientes.

O volume final da reação foi de 50 µL, sendo 25 µL de *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems®, CA, USA) e 2 µl das amostras extraídas. A reação continha 3 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador. Todas as amostras foram produzidas em duplicata. A reação foi efetuada com 40 ciclos.

A análise, interpretação e registro dos resultados dos testes foram efetuados com o auxílio dos *softwares* ABI PRISM 7500 SDS (versão 1.4).

4.7 Análise de resultados

As análises de concordância entre os testes laboratoriais: Pesquisa direta do parasito, análise molecular de biópsias e saliva foram realizadas por meio de estatística descritiva, com distribuições absolutas e percentuais.

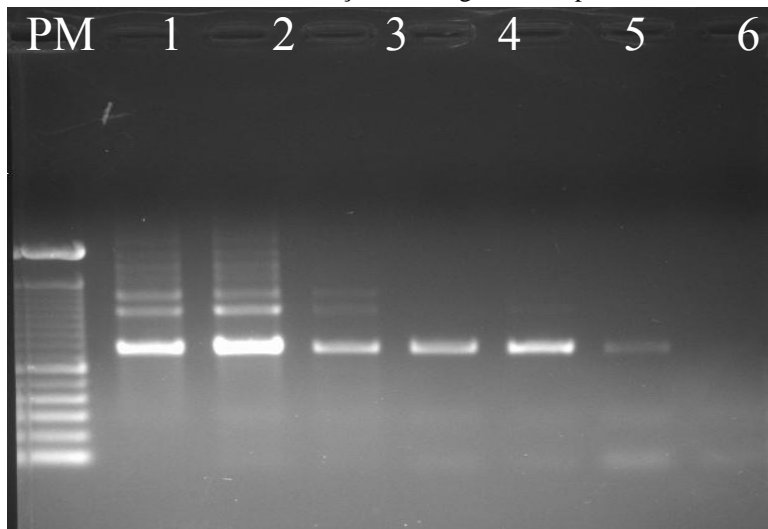
5 RESULTADOS

Substratos salivares de indivíduos acometidos pela LTA foram analisados a fim de detectar *Leishmania* subgênero *Viannia* como proposta de avaliação da aplicabilidade do método ao diagnóstico molecular para identificação do parasito. A análise foi dirigida para as características epidemiológicas dos indivíduos estudados, observações comparativas entre substratos distintos e técnicas diagnósticas distintas.

5.1 Limite de detecção dos métodos moleculares

Ao avaliar a sensibilidade da detecção de DNA de *Leishmania (Viannia) spp.* em cPCR foi obtido no presente estudo o limite de 10 fg/ μ L (Figura 14).

Figura 14- Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio, mostrando bandas específicas para *Leishmania (Viannia) braziliensis* com limite de detecção de 10 fg de DNA padrão.

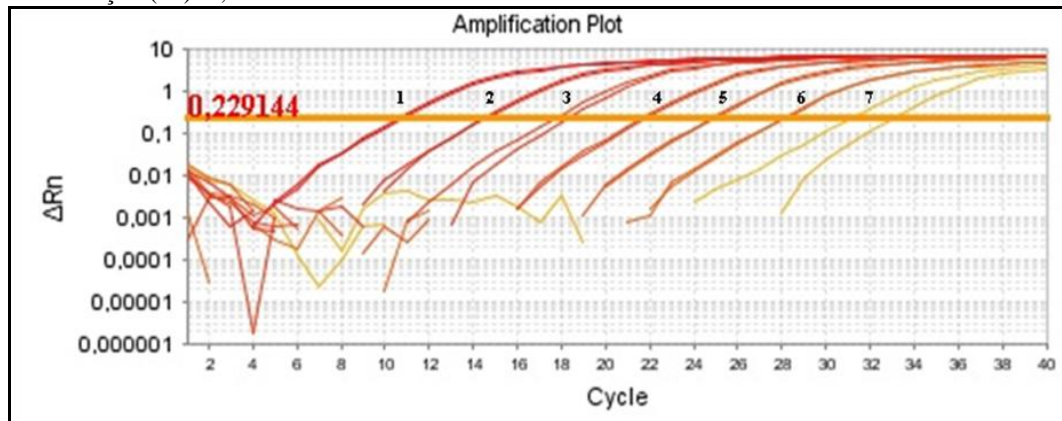


Fonte: A autora

Legenda: PM (Marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb, Invitrogen) (2072, 1500, 600, 100 pb), linhas 1 a 7 (concentrações de DNA: 10 ng/ μ L, 1 ng/ μ L, 10 pg/ μ L, 1 pg/ μ L, 100 fg/ μ L, 10 fg/ μ L e 1 fg/ μ L).

Ao avaliar a sensibilidade da detecção de DNA de *Leishmania (Viannia) spp.* em qPCR foi obtido no presente estudo o limite de 1 fg/ μ L (Figura 15).

Figura 15- Curva-padrão de *L. braziliensis* (IOC-L-566-MHOM/BR/75/M2903) com limite de detecção de 1 fg. A eficiência analítica da reação (ϵ) = 92,74%. Slope: -3,509; coeficiente de determinação (R^2): 0,99.



Fonte: A autora.

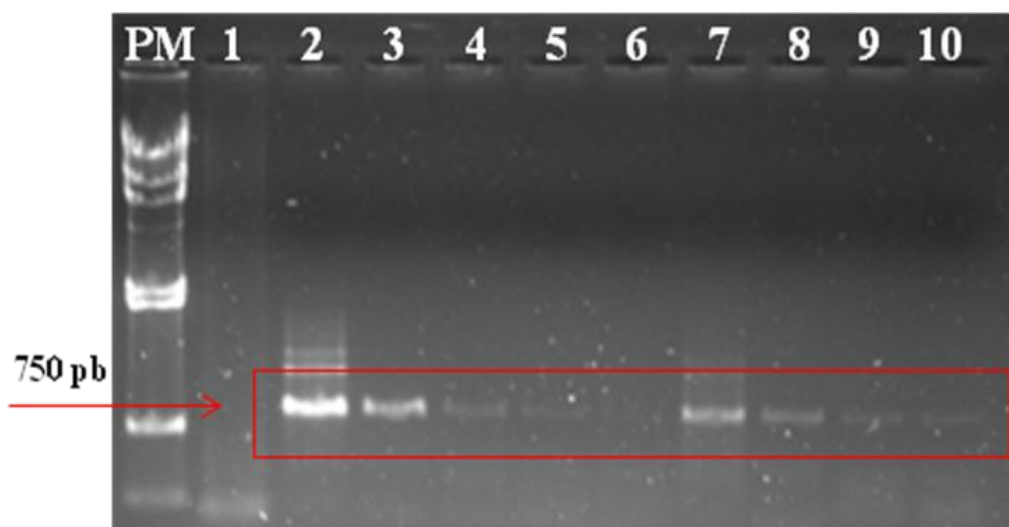
Nota: Amplification plot – Mapa de amplificação; Cycle- ciclo;

Legenda: 1 a 7 - concentrações de DNA: 10 ng/μL, 1 ng/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL, 10 fg/μL e 1 fg/μL respectivamente.

5.2 Detecção do DNA de *Leishmania* (*V.*) spp por cPCR e qPCR, em fluidos salivares em pacientes com LTA

Em se tratando das amostras dos pacientes incluídos no estudo foi possível a detecção de *Leishmania* (*V.*) spp. em 10 (25%) amostras de fluidos salivares, a partir da técnica de cPCR (Figura 16).

Figura 16- Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio, mostrando produtos amplificados a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o subgênero *Viannia*

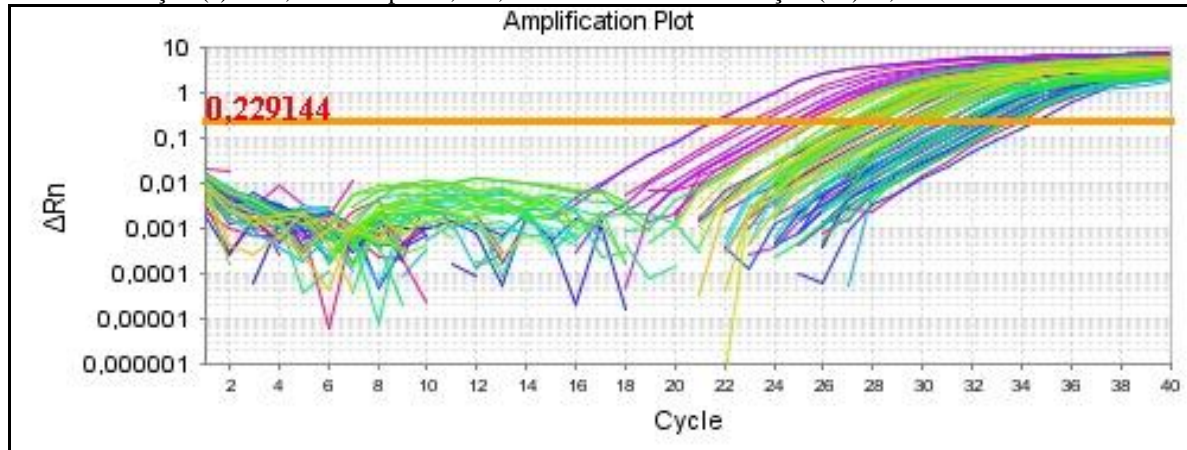


Fonte: A autora.

Legenda: Controle negativo (1), controles positivos 1ng e 100 pg (2 e 3, respectivamente). Amostras de *swab* salivar (4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10). O produto de amplificação de 750 pb encontra-se indicado por seta. M, marcador de peso molecular λ + *Hind* III (23,1, 9,4, 6,6, 4,4, 2,3, 2,0 e 0,56 kb).

Em amostras analisadas através da PCR em tempo real foram positivas 36 amostras, representando 90% do total estudado (Figura 17).

Figura 17- Análise da detecção de *Leishmania* (*V.*) em saliva a partir da curva de amplificação. A eficiência analítica da reação (ϵ) = 92,74%. Slope: -3,509; coeficiente de determinação (R^2): 0,99



Fonte: A autora.

Legenda- Na imagem estão representadas as 40 amostras de pacientes. O experimento foi realizado juntamente com a curva de diluição (Figura 15). As amostras positivas obtiveram amplificação até o ciclo 33 (36 amostras), as amostras negativas amplificaram após o ciclo 33 (4 amostras).

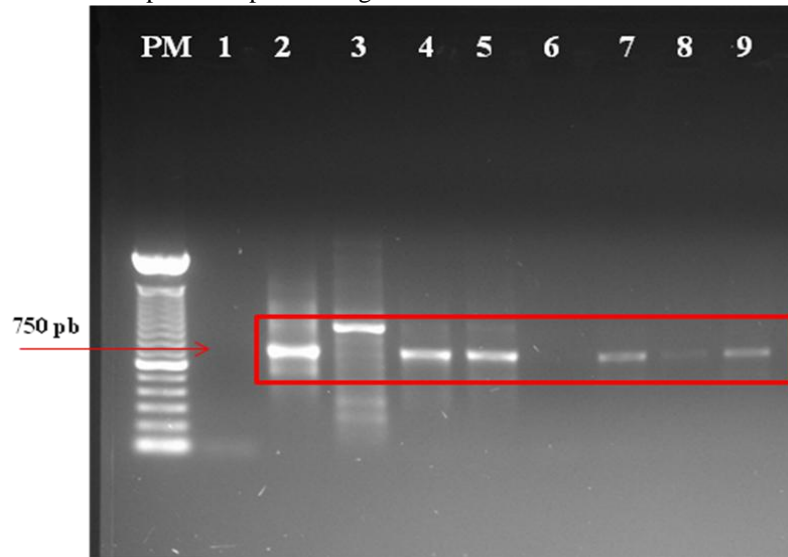
Estes resultados também foram confirmados através de outros testes como a pesquisa direta e teste molecular em biópsia. Os achados demonstram a viabilidade do substrato salivar como local de ocorrência do parasito e ao mesmo tempo do método de coleta, a partir de amostras de *swab* associadas à técnica de PCR convencional em tempo real.

5.3 Comparação do desempenho dos substratos (saliva e biópsia) através do cPCR

O diagnóstico molecular foi realizado nos dois substratos (saliva e biópsia) através da cPCR, descrita no item 4.6.2.2.

Na análise das amostras em saliva verificou-se a presença de *Leishmania* (*V.*) spp. em 25% (10/40) das amostras. A figura 18 mostra os resultados de positividade em saliva para LTA.

Figura 18- Eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídio, mostrando produtos amplificados a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o subgênero *Viannia*.

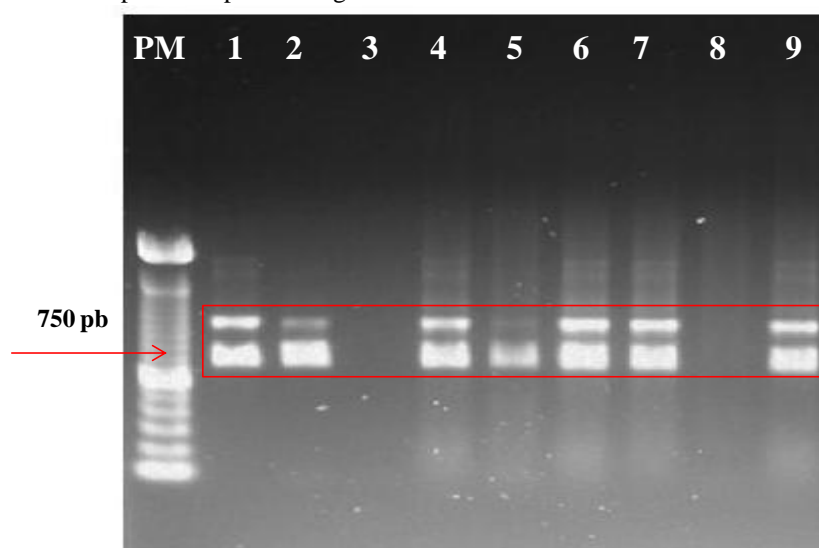


Fonte: A autora.

Legenda: Controle negativo (1), controles positivos 1ng e 100 pg (2 e 3, respectivamente). Pacientes positivos em *swab* salivar (4, 5, 7, 8 e 9). O produto de amplificação de 750 pb encontra-se indicado por seta. M, marcador de peso molecular λ + *Hind* III (23,1, 9,4, 6,6, 4,4, 2,3, 2,0 e 0,56 kb).

Verificando-se o resultado de biópsia foi possível detectar o parasito em 28 das 40 amostras analisadas (70%). A figura 19 retrata alguns destes resultados.

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio, mostrando produtos de PCR de amostras de biópsia amplificados a partir de iniciadores específicos para o subgênero *Viannia*.



Fonte: A autora.

Legenda: Controles positivos 1ng e 100 pg (1 e 2 respectivamente); Controle negativo (3). 4-9: Amostras provenientes de biópsia. O produto de amplificação de 750 pb encontra-se indicado por seta. M, marcador de peso molecular λ + *Hind* III (23,1, 9,4, 6,6, 4,4, 2,3, 2,0 e 0,56 kb).

Comparando as amostras de substratos de biópsia e saliva, através de cPCR podemos observar que 20 amostras (50%) foram concordantes em seus resultados. Entre as 20 amostras divergentes, 19 foram positivas em biópsia e apenas uma em saliva (Tabela 2).

Tabela 2- Comparação do desempenho dos substratos de biópsia e saliva através de cPCR.

cPCR		Amostras estudadas	%
Biópsia	Swab salivar		
+	+	9	
-	-	11	50
+	-	19	
-	+	1	50
TOTAL		40	100

Fonte: A autora

Legenda: cPCR – PCR Convencional.

5.4 Comparação do desempenho dos substratos saliva (qPCR) com amostras de biópsia (cPCR)

Na análise das amostras em saliva através de qPCR verificou-se a presença de *Leishmania (V.)* spp. em 90% (36/40) das amostras. Verificando-se o resultado de biópsia foi possível detectar o parasito em 28 das 40 amostras analisadas (70%).

Ao compararmos as amostras de biópsia (amostras analisadas através da cPCR) com as amostras de saliva (analisadas através de qPCR) podemos observar uma compatibilidade de 27 amostras (67,5%), e entre as amostras que divergiram, 2 amostras foram positivas em biópsias e negativas em saliva, e 11 positivas em saliva e negativas em biópsias (Tabela 3).

Tabela 3- Comparação do desempenho dos substratos de biópsia (cPCR) e saliva através de qPCR.

		Amostras estudadas	%
Biópsia (cPCR)	Swab salivar (qPCR)		
+	+	26	
-	-	1	67,5
+	-	2	
-	+	11	22,5
TOTAL		40	100

Fonte: A autora.

Legenda: cPCR – PCR Convencional; qPCR- PCR em tempo real.

5.5 Comparação do diagnóstico parasitológico da LTA, através da pesquisa direta, com o diagnóstico molecular, por cPCR em fluidos salivares

Com a utilização do método parasitológico de pesquisa direta, observou-se que 35 amostras (87,7%) apresentaram resultados positivos para *Leishmania (V.)* spp.

Na comparação entre o diagnóstico parasitológico e o diagnóstico molecular, realizado em amostras de saliva, através da cPCR obtivemos 32,5% (13/40) de concordância e 67,5% (27/40) de divergência. Vinte e sete amostras foram positivas somente em pesquisa direta e uma amostra positiva somente na saliva (Tabela 4).

Tabela 4- Resultados de diagnósticos parasitológicos e moleculares (cPCR) dos doentes que se enquadravam na definição de caso de LTA.

Métodos		Amostras estudadas	
PD	Swab salivar (cPCR)		%
+	+	9	
-	-	4	32,5
+	-	27	
-	+	0	67,5
TOTAL		40	100

Legenda: PD – pesquisa direta

5.6 Comparação do diagnóstico parasitológico da LTA, através da pesquisa direta, com o diagnóstico molecular, por qPCR em fluidos salivares

Na comparação entre o diagnóstico parasitológico e o diagnóstico molecular, realizado em amostras de saliva, através da qPCR obtivemos uma maior concordância perfazendo 77,5% (31/40) e 22,5% (9/40) de divergência. Quatro amostras foram positivas somente em pesquisa direta e cinco amostras positivas somente na saliva (Tabela 5).

Tabela 5- Resultados de diagnósticos parasitológicos e moleculares (qPCR) dos doentes que se enquadravam na definição de caso de LTA.

Métodos		Amostras estudadas	
PD	Swab salivar qPCR		%
+	+	31	
-	-	0	77,5
+	-	4	
-	+	5	22,5
TOTAL		40	100

Fonte: A autora.

Legenda: PD – pesquisa direta; qPCR- PCR quantitativa em tempo real

5.7 Comparação do diagnóstico molecular da LTA, através da cPCR e qPCR

A partir dos resultados obtidos em PCR convencional e PCR em tempo real foi possível a comparação entre as duas técnicas moleculares que obtiveram 14 (35%) amostras convergentes e 26 (65%) amostras divergentes, sendo 26 positivas apenas na qPCR (Tabela 6).

Tabela 6- Comparação do diagnóstico molecular da LTA em saliva, através da PCR convencional e qPCR

Métodos		Amostras estudadas	
cPCR	qPCR		%
+	+	10	
-	-	4	35
-	+	26	
+	-	0	65
TOTAL		40	100

Fonte: A autora.

Legenda: cPCR – Reação em cadeia da polimerase convencional; qPCR- PCR quantitativa em tempo real.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, a fim de avaliarmos o emprego de *swab* em saliva para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana em pacientes de área endêmica de Pernambuco, foram utilizados métodos laboratoriais clássicos como parasitológicos e moleculares. Há uma escassez na literatura acerca do substrato salivar para LTA, por não fazer parte como alvo de coleta de *Leishmania* (*V*) spp. Foram evidenciados aspectos técnicos na utilização do *swab* em saliva e a ocorrência desses parasitos no substrato, até então não bem discutidos. Houve um particular interesse em focar características epidemiológicas que envolvem os indivíduos estudados e observações comparativas entre substratos distintos: biópsia cutânea, escarificação cutânea e saliva. Houve também a necessidade de comparação entre técnicas diagnósticas distintas: pesquisa direta do parasito, PCR convencional e PCR em tempo real. As implicações dos resultados alcançados serão discutidas no presente estudo.

Os critérios utilizados para inclusão dos pacientes no estudo compreenderam indivíduos que além de atenderem a aspectos clínico-epidemiológicos, apresentavam lesões cutâneas típicas e presença adicional de positividade em pelo menos um dos testes diagnósticos seguintes: pesquisa direta do protozoário na lesão e teste molecular em biópsia. Em relação aos critérios de exclusão do estudo, foram observados pacientes com lesões cutâneo mucosas. Procedendo dessa forma, 40 pacientes foram enquadrados como portadores de LTA com base na clínica e epidemiologia, sendo sujeitos do estudo portadores que não apresentavam quaisquer lesões oronasais.

O crescente número de casos autóctones da LTA e o aumento da notificação compulsória reforçam a necessidade da utilização de métodos combinados para o melhor entendimento da incidência da doença em localidades endêmicas.

6.1 Análise do perfil epidemiológico

Quando foram analisadas as características epidemiológicas que envolvem os acometidos pela LTA, em nosso estudo, houve predominância de indivíduos do sexo masculino (65%) com idade média de 34,6 anos, infectados por exposição ocupacional durante o trabalho agrícola. A população de estudo residia na zona rural das cidades. Nossos resultados corroboram com o estudo realizado por Rodrigues et al. (2002) quando foi analisada a distribuição de portadores de LTA no município de Amaraji, Pernambuco,

confirmado uma predominância de casos do sexo masculino na faixa etária de 10 a 29 anos (57,5%), seguidos dos mesmos resultados acima.

Isso sugere que esses indivíduos estejam mais expostos ao risco de infecção, através de uma maior proximidade do vetor, possíveis reservatórios sinantrópicos e silvestres, contribuindo para a manutenção da endemia na região (BRANDÃO-FILHO et al., 2003, GUIMARÃES et al., 2012). Variações encontradas em faixas etárias mais acometidas em indivíduos com LTA parecem ser peculiares a cada área endêmica, demonstrando uma característica socioeconômica.

6.2 Análise da detecção de *Leishmania* (V.) spp, em fluidos salivares

Em outra etapa de análise, foi avaliada a sensibilidade da detecção de DNA de *Leishmania* (*Viannia*) spp., e foi obtido no presente estudo o limite de 10 fg/ μ L através da técnica de PCR convencional.

O sistema de PCR convencional baseado em de Bruijn e Barker (1992) é específico para o subgênero *Viannia* e amplifica um produto de 750 pb. No presente estudo, foram amplificados minicírculos inteiros do kDNA de biópsias cutâneas e fluidos salivares. A escolha por este alvo molecular é devido a sua abundância no genoma mitocondrial de tripanosomatídeos e, além disso, deve-se ao fato do sistema diagnóstico ter sido validado para a LTA em Pernambuco (RODRIGUES et al, 2002). Do total de amostras analisadas (n=40), 10 (25%) foram positivas em substrato salivar, como observado na Figura 14. Os indivíduos que participaram do estudo não apresentaram quaisquer lesões mucocutâneas.

Na busca de estudos que possam corroborar com os nossos achados, Corvalan et al. (2011) propuseram a saliva humana como um novo tipo de amostra para ser utilizada na identificação de parasitos causadores da leishmaniose, como *Leishmania* (*L.*) *chagasi*, *L.* (*V.*) *amazonensis* e *L.* (*V.*) *braziliensis*. Esse estudo foi composto por quatro pacientes que possuíam lesões exclusivamente mucocutâneas. Os seus resultados identificaram apenas a espécie *L.* (*V.*) *braziliensis* envolvida na saliva. Apesar de identificar apenas uma das espécies de *Leishmania* (CORVALAN, 2012), este tema serviu de base para a nossa pesquisa. É pertinente mencionar que, até o presente, as evidências incriminam a *L.* (*V.*) *braziliensis* como único agente causador de LTA nas áreas endêmicas de Pernambuco (BRITO et al. 1993; RODRIGUES et al. 2002).

A busca por métodos de coleta de material para PCR, que sejam mais práticos e menos invasivos e agressivos, tem sido o objetivo de alguns autores. Mimori et al. (2002), coletando

exsudato da lesão com uma haste de algodão obtiveram uma sensibilidade de 93,8%, utilizando oligonucleotídeos iniciadores V1 e V2 para os parasitos do subgênero *Viannia* e L1 e L2 para o subgênero *Leishmania*, e espécie específica b1 e b2 para *L. (V.) braziliensis*, p1 e p2 para *L. (V.) panamensis*, g1 e g2 para *L. (V.) guyanensis*, m1 e m2 para *L. (L.) mexicana* e a1 e a2 para *L. (L.) amazonensis*, demonstrando em seus achados a possibilidade de detecção de *Leishmania* a partir da coleta feita através de saliva, como método não invasivo. Em 2012, Brito et al., em estudo que abordou acidente ocupacional, obtiveram sucesso no diagnóstico da LTA ao coletar amostras utilizando *swab* combinados à técnica de PCR convencional, confirmando a eficiência do método.

Avaliando a sensibilidade da detecção de DNA de *Leishmania (Viannia) spp.* através da PCR em tempo real foi obtido no presente estudo o limite de 1 fg/ μ L, demonstrando uma maior sensibilidade.

A detecção de DNA *Leishmania (V.) spp.* em saliva, coletadas com o *swab*, através da PCR em tempo real, podemos observar positividade em 90% (36/40) das amostras do estudo. Os resultados ratificam a utilização da saliva como alvo diagnóstico para LTA e demonstram a alta sensibilidade e especificidade da técnica molecular usada (qPCR) aliada a um sistema de oligonucleotídeos específicos para kDNA, contribuindo para uma acurada detecção do material genético do parasito na saliva, até então pouco descrito na literatura.

A PCR em tempo real vem sendo empregada nos últimos anos como uma ferramenta eficaz e importante nos estudos diagnósticos e acompanhamento de algumas doenças, como HIV, hepatite C (RAOULT et al., 2004) e algumas parasitoses, como a toxoplasmose e leishmaniose visceral.

Um estudo realizado por Kompalic-Cristo et al. em 2007 examinou o valor diagnóstico da PCR em tempo real para detectar e quantificar *Toxoplasma gondii* em sangue humano e pode se concluir que o sistema é capaz de quantificar, acuradamente, leituras parasitárias em baixas concentrações, podendo assim verificar um aumento no número de parasitos em indivíduos sorologicamente identificados com toxoplasmose aguda, contribuindo para um rápido tratamento. Em se tratando da utilização da PCR em tempo real para LV, alguns autores propõe a técnica como padrão ouro (MARY et al., 2004), e aplicam esta ferramenta com sucesso em estudos sobre a interação parasito-hospedeiro, carga parasitária, e no monitoramento da terapia em cães e pacientes humanos (FRANCINO et al., 2006; MARY et al., 2004; MORTARINO et al., 2004; NICOLAS et al., 2002; ROLÃO et al., 2004; ROURA; SANCHEZ; FERRER, 1999; VITALE et al., 2004; WORTMANN et al., 2004).

Lombardo et al. (2012) utilizaram a técnica de qPCR para detecção de *Leishmania (L.) infantum* em amostras coletadas a partir de *swab* oral e conjuntivas de cães, e a comparou com métodos clássicos (Imunofluorescência indireta e teste de hipersensibilidade cutânea), os seus resultados demonstraram a aplicabilidade da associação de métodos não invasivos com a técnica de PCR em tempo real, corroborando com os nossos estudos.

Mais recentemente foi possível a detecção de *Leishmania (V.)* spp. através de PCR em tempo real, em amostras de sangue de cães. Nesse estudo foram desenvolvidos e testados alguns alvos moleculares como a região do kDNA, ITS1 e SSU rDNA, específicos para o parasito, e pode se identificar como o melhor o alvo, pela sua maior especificidade o kDNA, contendo 138 pb, sendo gênero específico (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013). De fato, essa molécula minicircular apresenta-se bastante abundante no genoma mitocondrial em todos os tripanosomatídeos, o que permite o aumento da sensibilidade em métodos diagnósticos moleculares.

Assim, a avaliação do método de coleta de *swab* através do substrato salivar, em pacientes com LTA tem sido proposta como uma alternativa interessante e auxiliar a prática laboratorial, para esta endemia. A simplificação dos procedimentos de coleta e processamento das amostras, a preparação dos reagentes em laboratórios de referência e a utilização da PCR convencional contribuem para uma adequada metodologia à saúde pública, aplicadas em municípios com poucos recursos. A obtenção de biópsias em áreas endêmicas não é tarefa simples, devido aos inconvenientes inerentes a esse procedimento. Torna-se evidente que a utilização de amostras clínicas alternativas seria mais adequada, desde que associadas à técnica de PCR simples (MICHALSKI et al., 2002; MINODIER et al., 1997; MÜLLER et al., 2003; WEIGLE et al., 2002;). Matsumoto et al. (1999) compararam os resultados de PCR utilizando como amostras exsudato/raspado cutâneo, fluido aspirado por seringa e biópsias da lesão, concluindo que a coleta de exsudato/raspado das lesões cutâneas era fácil e indolor para os doentes em comparação com os outros procedimentos. Além disso, os resultados eram similares àqueles obtidos com biópsias, opinião compartilhada por Belli et al. (1998).

A coleta realizada a partir de *swab* salivar facilita a obtenção, a estocagem e o processamento das amostras, principalmente em recém-nascidos, crianças e idosos que vivem em locais onde os postos de saúde são carentes de infraestrutura, como é o caso dos pacientes portadores de LTA que vivem em áreas rurais. Além das vantagens supracitadas, este método de coleta pode ser realizado por um profissional de saúde, desde que qualificado para tal procedimento. Não há necessidade de utilização de anestesia, além de possibilitar um menor risco de contaminação da amostra ao ser manuseada.

Além disso, a proposta objetiva a utilização da coleta salivar como método totalmente não invasivo, não proporcionando desconforto ao paciente.

Os resultados obtidos neste estudo comprovam a viabilidade do método de coleta através do substrato salivar, conforme discutido ao longo desta seção. O trabalho não objetiva substituir a coleta de saliva pela coleta de parasitos em lesão cutânea, mas que compartilhe como método e auxiliar ao diagnóstico da LTA, associado à técnica de PCR, neste caso, como instrumento de alta sensibilidade e especificidade.

6.3 Comparação do desempenho dos substratos (biópsia e saliva) através do diagnóstico molecular

Um foco abordado no presente trabalho foi comparar o desempenho dos substratos (biópsia e saliva) através das técnicas de cPCR e qPCR. Em nossos achados detectamos 70% de positividade utilizando biópsia cutânea e compatibilidade de 50% em relação às amostras de saliva detectadas por cPCR. Em relação a qPCR obtivemos uma concordância de 67,5% e nos 33,5% de amostras divergentes 2 foram positivas em biópsia e negativas em saliva e 11 amostras foram positivas em saliva, demonstrando uma melhor sensibilidade da técnica de PCR em tempo real, corroborando com dados da literatura (FRANCINO et al., 2006). Nos estudos que dão sustentabilidade à nossa pesquisa (CORVALAN, 2012; LOMBARDO et al., 2012; MIMORI et al., 2002; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013; SARAVIA et al., 2009; WONG, 2006) não é mencionada análise comparativa entre esses substratos destacados acima.

A divergência dos resultados, no caso da comparação dos substratos saliva e biópsias analisadas através da PCR convencional, onde 19 amostras foram positivas somente em biópsia, pode ser explicada pela sensibilidade da técnica em relação as amostras utilizadas. Esses achados são confirmados ao analisarmos a comparação das amostras de biópsia (analisadas por cPCR) e saliva através de PCR em tempo real, onde a técnica de qPCR alcançou uma maior sensibilidade e 11 amostras foram positivas em saliva e negativas em biópsia. A saliva até então não é descrita na literatura como um local de ocorrência do parasito, e acredita-se que devido a características do substrato a quantidade de DNA de parasitos seja bastante reduzida, necessitando de uma técnica bastante sensível, como a qPCR, para ser detectado.

Os resultados alcançados pelo nosso grupo apontam para algumas vantagens e questionamentos: i) a possibilidade de coleta de saliva através de *swab* bacteriológico, devido

à dificuldade de coleta de material tegumentar na borda de lesões cutâneas em locais, onde a precariedade prevalece principalmente em ambulatórios de áreas endêmicas; ii) o substrato salivar poderá ser um meio auxiliar para detecção de parasitos juntamente com a biópsia cutânea durante a rotina laboratorial para LTA; iii) a detecção de *Leishmania* spp. em veículo salivar abre questões quanto ao tropismo do parasito em local, até então, desconhecido

6.4 Comparações entre os diagnósticos parasitológico e molecular, realizado com o substrato salivar

Dentre os casos de LTA estudados no presente trabalho, houve comparação entre os diagnósticos parasitológico (realizado através do escarificado da lesão) e molecular, realizado com o substrato saliva. Obtivemos 32,5% (n=13) de concordância e 67,5% (n=27) de divergência quando compararmos com a cPCR. Na comparação entre o diagnóstico parasitológico e molecular realizado através da qPCR obtivemos uma compatibilidade de resultados em 77,5% das amostras e 22,5% de divergência. Torna-se compreensível comentar que a técnica de pesquisa direta (PD) definiu a maioria dos casos estudados, haja vista, tratar-se de uma abordagem parasitológica, onde a predominância de formas amastigotas é claramente evidente. Em amostras consideradas concordantes positivamente o resultado poderá apontar para características intrínsecas em cada caso (Tabela 4 e 5). É possível que alguns indivíduos acometidos pela LTA apresentem mecanismos de escape de parasitos para outros locais, sendo estes mais suscetíveis à metástase.

Alguns estudos mostram que os aspectos relacionados ao *status* imunológico do hospedeiro têm sido associados com a persistência parasitária em leishmanioses (AEBISCHER, 1994; BOGDAN et al. 1996; CUERVO, 2004; MENDONÇA, 2004; OSÓRIO et al. 1998; WEIGLE; SARAVIA, 1996;). Um desequilíbrio imunológico pode levar à disseminação do parasito por via linfática ou vascular (BARRAL et al. 1995).

6.5 Análise comparativa entre as técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real para o diagnóstico molecular da LTA

A partir da análise comparativa entre as técnicas de cPCR e qPCR para a detecção de *Leishmania* subgênero *Viannia* em saliva foram observadas concordâncias entre os resultados apresentados em 14 amostras de um total de 40, perfazendo 35%. Por outro lado, 65%

apresentou divergência (14/40), sendo consideradas amostras positivas apenas com a utilização da qPCR.

Francino et al. em 2006 realizaram um estudo em 25 cães com LT, onde foram comparadas as técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real, e observou uma maior eficiência da técnica de qPCR. O estudo também avaliou a parasitemia pós-tratamento propondo a validação da qPCR tanto para o diagnóstico da leishmaniose como para o controle da doença. Estes dados corroboram com nosso estudo, onde a eficiência da PCR em tempo real foi superior à PCR convencional para a detecção de DNA do parasito em saliva humana, para diagnóstico da LTA.

Recentemente em estudo duplo-cego, entre laboratórios do mesmo continente, foram comparados diferentes protocolos e alvos moleculares utilizando tanto a técnica de cPCR quanto a técnica de qPCR, para LTA. A pesquisa apontou alta sensibilidade com a qPCR, utilizando o kDNA como alvo, em amostras humanas (CRUZ et al.,2013). Os dados apresentados neste estudo ratificam a especificidade do kDNA em associação à qPCR, corroborando com os nossos achados. Assim a técnica de PCR em tempo real é uma ferramenta essencial para a detecção de DNA de *Leishmania* spp. em amostra de saliva, sendo até o momento um tema pouco discutido na literatura.

7 CONCLUSÕES

- 1) A demonstração da existência de DNA de *Leishmania (Viannia)* spp. em substrato salivar humano constitui um novo campo de investigação diagnóstica, corroborando para elucidar questões de natureza parasitológica e epidemiológica;
- 2) Os fluidos salivares aliados às técnicas moleculares demonstram praticidade como método auxiliar ao diagnóstico da LTA;
- 3) Os achados permitem o desenvolvimento do método de coleta totalmente não invasivo em localidades endêmicas para a LTA, auxiliando na triagem de pacientes;
- 4) O estudo aponta para um melhor conhecimento acerca do tropismo de *Leishmania (Viannia)* spp. em humanos, manifestando-se classicamente em tecido epitelial, e não em saliva.

8 PERSPECTIVAS

A aplicação da técnica de sequenciamento tem gerado um campo específico na área genômica contribuindo bastante para estudos genotípicos, principalmente através da caracterização de sequências de DNA, de interesse à saúde pública, tornando-se assim uma das nossas perspectivas para o estudo: a caracterização molecular das amostras de saliva, coletadas a partir de *swab*, para que possamos identificar as espécies presentes nessas amostras. Associado a isto, pretendemos realizar o cultivo de *Leishmania* em meio apropriado para que possamos ratificar com todos os ensaios acerca da caracterização desse protozoário.

Portanto, no que tange à caracterização de parasitos circulantes em saliva humana, a proposta permitirá uma investigação de maneira mais particular quanto ao repertório de *Leishmania* spp. na mucosa bucal. Espécies distintas ou com capacidade de resistência superior à terapêutica convencional podem gerar vieses epidemiológicos, o que compromete o tratamento individual, além de permitir um planejamento integrado e adequado quanto às medidas de controle empregadas atualmente.

Outra perspectiva tão importante quanto o rastreamento através de sequenciamento, trata-se dado cultivo *in vitro* das amostras de saliva, sendo mais uma alternativa para a caracterização de *Leishmania* spp., onde será possível o isolamento do parasito para o desenvolvimento de estudos que permitam ampliar o enfoque dessa enfermidade.

Desta forma, vale ressaltar que essa pesquisa apresenta uma importância ímpar e contribuirá de forma substancial para o estudo da LTA. A partir de nossos estudos poderemos esclarecer questionamentos referentes ao tropismo e mecanismos de escape do parasito, que se comporta de maneira peculiar no hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- AEBISCHER, T.; MOODY, S.F.; HANDMAN, E. Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host. **Infection and Immunity**, Washington, v.61, p. 220-226, 1993.
- AEBISCHER, T. Recurrent cutaneous leishmaniasis: a role for persistent parasites? **Parasitology today**, Cambridge, v.10, n .1, p 25-8, 1994.
- ALMEIDA R.P et al. Evaluation of cellular immune responses in patients with different clinical forms of tegumentary leishmaniasis. **Journal of allergy and clinical immunology**, St. Louis, v.14, p.1-9, 1995.
- ALMEIDA, I. A. Z. C., et al. Coqueluche: avaliação de 10 anos de diagnóstico laboratorial na região Noroeste do Estado de São Paulo, 2001-2011. **Boletim Epidemiológico Paulista**. São Paulo, v. 8, n. 90, p. 16-23, 2011.
- ALLIAGA, L. et al. Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: clinical and microbiologic findings in 31 patients. **Medicine**, Baltimore, v .82, p. 147-158, 2003.
- ALVAR, J. et al.,. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ANDRADE, S.L. et al. Leishmaniose Tegumentar Americana em área de ocupação recente na periferia da cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil – fatores associados ao risco de infecção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, Sup.1, p.18-19, 1999.
- AMATO, V. S., et al. Treatment of Mucosal Leishmaniasis in Latin America: Systematic Review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Baltimore, v.77, p. 266-274, 2007.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **Applications ; Technologies/qPCR (Real-Time PCR)/TaqMan® and SYBR® Green Chemistries** . Disponível em: <<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html>>. Acesso em: 15 de Março. 2015.
- AVILLES, H. et al. PCR detection and identification of *leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 85, p.181-187, 1999.
- ARAÚJO, A.I.F. **Avaliação do método de coleta através do SWAB para o diagnóstico molecular da Leishmaniose Tegumentar Americana em pacientes de áreas endêmicas de Pernambuco, Brasil**. 2013. Dissertação (Mestrado)- Centro de pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz-PE. Recife, 2013.

- BAÑULS, A.L.; HIDE, M.; TIBAYRENC, M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 29, p.1137-1147, 1999.
- BARRAL, A. et al. Transforming growth factor β as a virulence mechanism for *Leishmania brasiliensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Atlanta, 90, p. 3442-3346, 1993.
- BARRAL, A et al. Leishmaniasis in Bahia Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.44, p. 536-546, 1991.
- BARRAL, A. et al. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.53, n.3, p.256-259, 1995.
- BARKER, D.C.; BUTCHER, J. The use of DNA probes in the identification of leishmanias: discrimination between isolates of *Leishmania mexicana* and *Leishmania braziliensis* complexes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.77, p. 285-297, 1983.
- 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. 328-347, 2004.
- BEJ, A.K. et al. Multiples PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. **Molecular and Cellular Probes**, London, v.4, p. 353-365, 1990.
- BELLI, A. et al. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.58, p.102-109, 1998.
- BODGAN, C.; ROLLINGHOFF M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International journal for parasitology**, New York, v.28, n.1, p. 121-134, 1998.
- BODGAN, C. et al. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Current opinion in immunology**, Philadelphia, v. 8, n. 4, p.517-525, 1996.
- BRACHO, C.O. et al. Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis diagnosis: a validation study. **Memórias do Instituto Oswaldo cruz**, Rio de Janeiro, v.102, n.5, p. 549-554, 2007.
- BRANDÃO-FILHO, S.P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in North-East Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.93, p. 488-494, 1999.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. **Ecoepidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana associada à *Leishmania (Vianna) braziliensis* na Zona da Mata Atlântica do Estado de**

Pernambuco, Brasil. Tese- (Doutorado em Ciências)- Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2001.

BRANDÃO-FILHO, S.P. et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.97, p. 291-296, 2003.

Boletim Epidemiológico Eletrônico. Brasília, **Secretária de vigilância em saúde**, v.10, 2010.

BRASIL. Departamento de informática do SUS. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 15 Nov. 2014.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. Ed. atual – Brasília: Ed. do Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. **Situação da Prevenção e Controle das Doenças Transmissíveis no Brasil**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde/Centro Nacional de Epidemiologia, p.28-29, 2003.

BREMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.24, p.684-703, 1997.

BRYCESON, A.D.M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia I. The clinical and histological features of the disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 63, p. 708-737, 1969.

BRITO M.E.F. et al. Leishmaniose cutânea no nordeste do Brasil: uma avaliação crítica dos estudos realizados no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.45, n.4, p. 425-445, 2012.

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. 1-9, 2009.

BRITO, M.E.F. et al. Human cutaneous leishmaniasis due to a new enzymatic variant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* occurs in Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, n.4, p.633-634, 1993.

BRUJIN, M.H.L. et al. A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v.44, p.201- 207, 1993.

BRYCESON, A.D.M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. II. Treatment. III. Immunological studies. IV. Pathogenesis in DCL. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 64, p.369-374, 1970.

CAVALCANTI, M. P; LORENA, V. M. B ; GOMES, Y. M. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 1, p. 1-14, 2008.

CHAMBERLAIN J.L, et al. Detection screening of Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, London, v. 16, p. 11141-11156, 1988.

CIFUENTES, M. C. B, OSPINO, P. D, ARIAS L. F. C. La Leishmania spp. Como estratégia de diagnóstico y tratamiento de la leishmaniasis, umartículo de revision. **Investigação Andina**, Pereira, v. 9, n. 15, p.64-76, 2007.

CONVIT, J.; KERDEL-VEGAS, F.; GORDON, B. Disseminated anergic cutaneous leishmaniasis. **British Journal of Dermatology**, London, v. 74, p.132-135, 1962.

CORVALAN, F.H., et al. DNA identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.17, p. 98-102, 2011.

CORVALAN, F.H. **Detecção de DNA de Leishmania braziliensis através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em saliva de pacientes com leishmaniose tegumentar americana**.2011.Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Brasília, Mato Grosso do Sul, 2011.

COSTA, J.M.L. et al. Modalidades, Diagnóstico e Terapêutica da LT no Brasil, **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v.79 , sup.3, p.70-83, 2009.

COSTA, J. M. L. Modalidades clínicas da leishmaniose tegumentar. In: BARRAL, A.; COSTA, J. M. L. **Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas**. 1 ed. Bahia: Contexto. cap. 13, p. 137-145, 2011.

CRUZ, I. et al. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, New York, v. 134, p. 281-289, 2013.

COURA J.R., GALVÃO-CASTRO B., GRIMALDI G. Disseminate American cutaneous leishmaniasis in a patient with AIDS. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.82, n.4, p. 581-582, 1987.

CUBA CUBA, C.A. et al. Parasitologic and immunologic diagnosis of American (mucocutaneous) leishmaniasis. **Epidemiological Bulletin Pan American Health Organization**, Washington, v. 15, p. 249-259, 1981.

CUERVO, P. et al. *Leishmania (Viannia)*: genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. **Experimental Parasitology**, New York, v. 108, p.59-66, 2004.

DANTAS-TORRES, F. et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.43, n.6, p. 733-736, 2010.

DE BRUIJN, M.H.L.; BARKER, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: Specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, Basel, v.52, p.45-58, 1992.

DE ROSSELL, R.A. et al. "Is leishmaniasis ever cured?" **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 86, n. 3, p. 251-253, 1992.

DOLNÍK V. DNA sequencing by capillary electrophoresis (review). **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**; Amsterdam, v. 41, n.2/3, p. 103-119, 1999.

DORVAL, M.E.M.C.; OSHIRO, E.T.; CUPILLO, E. Ocorrência de Leishmaniose Tegumentar Americana no estado de Mato Grosso do Sul associado á infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.39, n.1, p. 43-46, 2006.

ERESH, S.; MCCALLUM, S.M.; BARKER, D.C. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. **Parasitology**, London, v.109, p.423-433, 1994.

FERNANDES, O. et al. Minicircle variable region probes for characterization of *Leishmania (Viannia)* species. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v.85, n.3, p. 563-568, 1999.

FERREIRA, M.P. et al. Sensitivity of an immunoenzymatic test for the detection of ant-L. *braziliensis* compared to the other test used for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.48, n.4, p.215-217, 2006.

FERREIRA, S. A. et al. Evaluation of the conjunctival *swab* for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 152, p. 257-263, 2008.

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

GEHA, D.J et al. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, p.1768-1772, 1994.

GONTIJO, B.; CARVALHO M.L. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.36, p.71-80, 2003.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**; São Paulo, v.7, n.3, p. 338-349, 2004.

GRAMICCIA, M. et al. Kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*. **Parasitology**, London, v. 105, p. 29-34, 1992.

GUIMARÃES, V.C. et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area to cutaneous and visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco,

Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba; v.45, n.1, p. 66-70, 2012.

HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 7276-7280, 1991.

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

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v.4, p. 1-24, 1990.

KOMPALIC-CRISTO, A. et al. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. **Parasitology research**, Berlin, v. 101, n. 3, p. 619-25, 2007.

KUBISTA, M. et al. The Real Time Polymerase Chain Reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford , v. 27, n. 2/3, p. 95-125, 2006.

JONES T.C. et al. Epidemiology of american cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Journal of Infectious Diseases** ,Chicago, v.56, p. 73-83, 1987.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.77 (5), p.569-596, 1983.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: COLLIER, L., BALOWS, A.; SUSSMAN, M. (Ed). **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases**, v. 5, 9 ed. Londres: Arnould, 1998, p. 241-266.

LASKAY, T. et al. Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.89, p.273-275, 1995.

LEITE, R. S. et al. The use of conjunctival *swab* samples for PCR screening for visceral leishmaniasis in vaccinated dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, São Paulo, v. 20, p. 36-41, 2011.

LIMA, A.C.V.M.R. **Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 de Diferentes Regiões do Brasil**. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

LOMBARDO, G. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 184, p. 10-17, 2012.

- LOPEZ, M. et al. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.49:, p.348-356 1993.
- LOUREIRO, C.C.P. et al. Leishmaniose: métodos diagnósticos. **Folha médica**, Rio de Janeiro, v.117, n.2, p.131-134, 1998.
- LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**. Washington, v.104, n.22, p. 9375-9380, 2007.
- MAGALHÃES, A.V. et al. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania b. braziliensis*. Padrões histológicos e estudo evolutivo das lesões. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 28, p. 253-262, 1986.
- MARINHO-JÚNIOR, J.F. **Identificação de hospedeiros reservatórios e espécies de *Leishmania* envolvidos na transmissão e manutenção da leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da Zona da Mata Norte de Pernambuco**. 2010. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.
- MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escemel, 1911). **Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. Londres, v. 80, p. 859- 876, 1986.
- MARSDEN P.D. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Três Braços, Bahia–Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 27, p.93-101, 1994.
- MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 5/6, p. 82-104, 1992.
- MAURÍCIO, I.L; STOTHARD, J.R; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Cambridge, v.16, n.5, p.188-189, 2000.
- MARY, C. et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington , v.42, n.11, p. 5249-5255, 2004.
- MATSUMOTO, T. et al. Comparasion of PCR results using scrape/exudate, syringe-sucked fluid and biopsy sample for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Ecuador. **Transations of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.93, p.606-607, 1999.
- MELLO, M.N.et al. Padronização do antígeno de Montenegro.**Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.19, p.161-164, 1997.
- MENDONCA, M.G. et al. “Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of american cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure?” **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, n. 6, p. 1018–1023, 2004.

MENDONÇA, S.C.F., SOUZA, W.J.S., NUNES, M.P. et al. Indirect Immunofluorescence test in New World Leishmaniasis: serological and clinical relationship. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 3, p. 347-355, 1988.

MILES M.A. et al. Leishmaniasis in Brazil: XV. Biochemical distinction of *Leishmania mexicana amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis* and *L. braziliensis guyanensis* – aetiological agents of cutaneous leishmaniasis in the Amazon Basin of Brazil. **Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.75, p.524-529, 1981.

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, Sep./Out. 2002.

MINODIER, P. et al. Rapid identification of causative species in patients with old world leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 10, p. 2551-2555, out. 1997.

MIMORI, T. et al. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. **Acta Tropica**, Basel, v.81(3), p.197-202, 2002.

MOMENI, A.Z. et al. Chronic lupoid leishmaniasis. Evaluation by polymerase chain reaction. **Archives of Dermatology**, Chicago, v.132, p.198-202, 1996.

MORAES, M.A., CORREIA, FILHO, D., SANTOS, J.B..Lymphadenopathies in American cutaneous leishmaniasis: comments on 2 cases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.26, n.3, p.181-5.1993.

MORIEARTY, P. et al. Borderline cutaneous leishmaniasis. Clinical, immunological and histological differences from mucocutaneous leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.20, p.15-21, 1978.

MORTARINO, M. et al. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania* **Parasitology**, London, v.46, p. 163-167, 2004.

MÜLLER, N. et al. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 114, p. 223-229, 2003.

NAVIN, T.R. et al. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 42, p.36-42, 1990.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

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

OSÓRIO, Y. et al. Reifection in American cutaneous leishmaniasis: evolution of clinical outcomes in the hamster model. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.93, n.3, p.353-356.1998.

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)- Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

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, n. 3-4, p. 122-128, 2013.

PITA-PEREIRA, D. et al. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of South Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. **American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 80, p. 593-595, 2009.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Ecologia das Leishmanioses: Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003, p. 291-309.

RAVEL, S. et al. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. **Acta Tropica**, Basel, v.59, p.187-196, 1995.

RAOULT, D.; FOURNIER, P. E.; DRANCOURT, M. What does the future hold for clinical microbiology?, **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 151-159, 2004.

REA, S. et al. Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. **Journal of dairy research**, London, v. 68, p. 689-698, 2001.

REITHINGER, R. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia) spp.* in dog blood and bone marrow. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, p.748-751, 2000.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious Diseases**, Philadelphia, v.7, n. 9, p.581-96, 2007.

REMME, J.H.F. et al. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. **Trends in Parasitology**, London, v. 18, p.421-426, Oct., 2002.

RIBEIRO F.A.Q.; LOPES- FILHO O. Doenças ulcerogranulomatosas e Otorrinolaringologia. In: Lopes Filho O, Campos CAH. **Tratado de otorrinolaringologia**. 1.ed., Rocca: São Paulo, 1994.

ROCHA, L.S. et al. Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 104, p. 461-466, 2010.

ROCHA, L. S. et al. Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 104, p. 461-466, 2010

RODRIGUES, E. H. G. et al. The compositional landscape of minicircle sequences isolated from active lesions and scars of American cutaneous leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, London, v. 6, p. 228-228, 2013.

RODRIGUES, E.H.G. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in a area of endemicity in northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 10, p. 3572-3576, 2002.

RODRIGUES, E.H.G. **Validação de abordagens moleculares para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana em Pernambuco**.2000. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2000.

RODRIGUES, E.H.G. **Análise de seqüências de minicírculos do kDNA obtidos de amostras clínicas (lesões ativas e cicatrizadas) de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana em Pernambuco**, 2006. Tese (Doutorado)- Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz , 2006.

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.

ROSELINO, A.M. Biologia molecular aplicada ás dermatoses. **Anais Brasileiro de dermatologia**, Rio de Janeiro, v.83(3), p. 187-203,2008.

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.

SALEM, J. I. et al. PKO - Alternative method for isolating mycobacteria from sputum. **Acta Amazonica**, Manaus, v.37, p. 419 – 424, 2007.

SANGER F et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 74, n.12, p. 5463-7, 1977.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SARAVIA, N.G. et al. Detection of *Leishmania* in Unaffected Mucosal Tissues of Patients with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania* (*Viannia*) Species. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 200, p.638–646, 2009.

SCHRIEFER, A.L.F. et al. Papel do Parasita e do Hospedeiro na Expressão Clínica das Leishmanioses. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 75, n. 1, Jan-Jun, p. 46-56, 2005.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. **Trends in Parasitology**, London, v.21, n.12, p.550-552, 2005.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and immunopathological spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.99, p. 239-251, 2004.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annual Review in Microbiology**, v. 41, p.363-82. 1987.

SING, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian journal of medical research**, New Delhi, v.123, p.311-330.2006.

SMYTH, A.J. et al. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**, London, v.105, p.183-192, 1992.

STUART, K. Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.9, p. 93-104, 1983.

TAO, S. C et al. One-tube nested RT-PCR enabled by using a plastic film and its application for the rapid detection of SARS-virus. **Biotechnology letters**, Dordrecht, v. 26, p. 179-183, 2004.

TALHARAI S. et al. Leishmaniose no Estado do Amazonas. Aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.63, p.433-438, 1998.

TUON, F. F., et al. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. **Clinical Immunology**, Orlando, v.128, p.442-6, 2008

UEZATO, H. et al. Comparative studies of the detection rates of *Leishmania* parasites from formalin, ethanol-fixed, frozen human skin specimens by polymerase Chain reaction and Southern blotting. **Journal of dermatological treatment**, Basingstoke, v.25, p.623-631, 1998.

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.

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, p. 489-496, 1987.

WEIGLE, K.A. et al. PCR – based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 40, p.601-606, 2002.

WHEELAND, R. G. **Cutaneous surgery**, 1 ed. v. 1, Philadelphia: Saunders, 1994.

WONG, D.T. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. **Journal of the american dental association**, Chicago, v. 137 (3), p.313-321, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Weekly epidemiological record**, Geneva, v.44 (77), p. 365-372, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **The Special Programme for Research and Training Diseases (TDR)** . Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>>. Acesso em: 15 dez. 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis**: disease information. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>>. Acesso em: 08 jul. 2010.

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.

YANG, S.; ROTHMAN, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 4, p. 337-348, 2004.

APÊNDICE A- Termo de consentimento livre e esclarecido



Centro de Pesquisas

1.1.1 Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



1.1 AGGEU MAGALHÃES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Grupo de Paciente Menor de 18 anos (ANEXO 1)

Senhor (a) Responsável pelo indivíduo menor de idade, convidamos o (a) menor a participar do projeto de pesquisa intitulado “Validação do método de *Swabsalivar* para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em pacientes de área endêmica de Pernambuco, Brasil, que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). O objetivo principal desta pesquisa é melhorar a detecção da doença leishmaniose tegumentar americana a partir de um método que não utiliza material que corte a pele, para identificação de espécies de *Leishmania*.

O (A) menor fará parte do grupo de pacientes, que será submetido à coleta de parasitos com a utilização de hastas flexíveis (cotonetes), em toda a área da lesão em pele e saliva, retirada de pequeno pedaço de pele da beira da ferida e coleta de 15mL de sangue venoso (que equivale a 1 colher de sopa). Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executá-lo. Quanto aos riscos, apesar de todas as medidas preventivas e cuidados tomados no sentido de proteger os voluntários, o menor poderá sentir algum desconforto ou ardência. A privacidade dele (a) será preservada e os dados pessoais serão confidenciais e mantidos sob sigilo, não sendo divulgados em nenhuma hipótese.

O estudo contribuirá para um melhor conhecimento da doença e detecção da leishmaniose tegumentar humana. Esse projeto levará a um tratamento mais rápido, com benefícios para o paciente, sendo considerado uma novidade, no que diz respeito ao procedimento de coleta de *Leishmania*. Antes da participação do menor no referido projeto, o senhor tem a total liberdade de pedir qualquer esclarecimento adicional que julgue necessário, que será esclarecido por um participante do estudo. O (A) Sr. (a) poderá recusar ou retirar o seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

Solicitamos sua autorização para que a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) possa utilizar as informações obtidas neste estudo em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a identidade do (a) menor, assim como estocar a amostra biológica para posterior estudo. Neste caso, o senhor (a) será informado, caso tenhamos que utilizar sua amostra em outra pesquisa.

Este documento será feito em duas vias, ficando uma em posse do participante e a outra com o coordenador da pesquisa.

Em caso de dúvidas ou outras informações posteriores o (a) Sr.(a) poderá entrar em contato com a equipe responsável (Eduardo Rodrigues e Edileuza Brito - CPqAM e Ângela Rapela – HUOC-UPE), através dos telefones abaixo e caso exista a necessidade de apresentar recursos ou reclamações em relação à pesquisa poderá entrar em contato com o Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, através do telefone (81) 2101-2639, o qual tomará as medidas cabíveis.

Nome do menor

Assinatura do responsável pelo menor e endereço

data

Assinatura do responsável pela pesquisa

data

Assinatura do médico responsável – HUOC-UPE

data

Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC-UPE), Rua Arnaldo Marques, s/n - Santo Amaro, Recife-PE. Fone: (81) 3413-1300.

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50.670-420. Recife – PE, Brasil. Tel.: (81) 2101 2566, Fax: (81) 2101 2640.
<http://www.cpqam.fiocruz.br>

APÊNDICE B- Tabela de pacientes analisados**Tabela - Relação dos pacientes analisados, com suas características clínicas e epidemiológicas, incluindo os resultados dos exames laboratoriais.**

Sexo	Idade	Localidade/PE	Ocupação	Lesão	SWS (cPCR)	Bp	P. D	SWS (qPCR)
M	59	Moreno	Agricultor	MI/Cabeça	+	+	+	+
F	44	Moreno	Agricultor	MS/MI e tronco	+	+	+	+
F	50	Moreno	Do lar	MI	+	+	-	+
F	48	Moreno	Agricultor	MI	-	+	+	+
M	7	Moreno	Estudante	MI	+	+	+	+
F	12	Moreno	Estudante	Face	+	+	+	+
F	66	Moreno	Do lar	MI	+	-	+	+
M	22	Moreno	Agricultor	MS	-	+	+	+
M	22	Guabiraba	Estudante	MI	+	+	+	+
F	17	Moreno	Do lar	MI	+	+	+	+
M	80	Recife-Aldeia	Aposentado	MI	-	+	+	-
M	56	Recife	Professor	MS	-	+	+	+
F	68	Moreno	Do lar	MI	-	-	+	+
M	23	Moreno	Auxiliar	MI	-	+	+	+
M	15	Moreno	Estudante	MS/MI	-	+	-	+
F	43	Moreno	Do lar	MI	+	+	+	+
F	69	Moreno	Agricultor	MI	-	+	-	+
M	74	Moreno	Agricultor	MI	-	+	+	+
F	59	Amaraji	Agricultor	MI	-	-	+	+
F	31	Amaraji	Do lar	MS	-	+	+	+
M	42	Moreno	Agricultor	MI	-	+	+	-
M	32	Bonito	Agricultor	MS	+	+	+	+
M	43	Moreno	Agricultor	MS	-	+	+	+
M	19	Moreno	Agricultor	Orelha	-	+	+	+
M	13	Moreno	Estudante	MI/MS	-	+	+	-
F	11	Moreno	Estudante	MS	-	+	+	+
M	27	Moreno	Agricultor	MI	-	-	+	+
F	58	Moreno	Agricultor	MI	-	+	+	+
M	53	Moreno	Agricultor	MI	-	+	-	+
M	21	Moreno	Agricultor	MS	-	+	+	+
M	12	Palmares	Estudante	Fronte	-	-	+	+
M	56	Amaraji	Agricultor	MI	-	-	+	+
M	45	Aldeia	Técnico	MI	-	+	+	+
M	17	Moreno	Estudante	MS	-	-	+	+
M	19	CIMINC	Militar	MS	-	+	-	+
M	19	CIMINC	Militar	MI	-	-	+	+
F	24	Paudalho	Do lar	MI/MS	-	-	+	+
M	19	CIMINC	Militar	Pescoço	-	-	+	+

M	41	Moreno	Agricultor	Região inguinal	-	-	+	+
M	11	Amaraji	Estudante	MI	-	-	+	-

Legenda: SWS (cPCR) - Diagnóstico molecular por PCR convencionanl em *swab* salivar; BP-Diagnóstico molecular por PCR em biópsia; PD-Diagnóstico parasitológico por pesquisa direta e SWS (qPCR)-Diagnóstico molecular por PCR quantitativa em tempo real.

ANEXO A- Parecer do Comitê de Ética

Título do Projeto: “Validação do método de Swab salivar para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em pacientes de área endêmica de Pernambuco, Brasil”.

Pesquisador responsável: Eduardo Henrique Gomes Rodrigues.

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 21/10/2011

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 42/11

Registro no CAAE: 0042.0.095.000 -11

PARECER Nº 44/2011

O Comitê avaliou as modificações introduzidas 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 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 25 de novembro de 2014. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 25 de novembro de 2011.


**Giselle Camposane Gouveia**
Farmacêutica
Coordenadora
Mat. SIAPE 0463376
CPqAm / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 25/11/2012.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br

