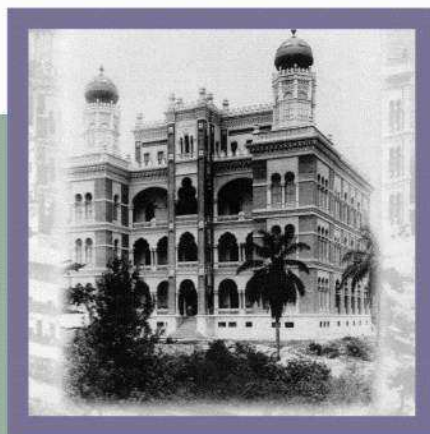


Fundação Oswaldo Cruz



**Centro de Pesquisas
Aggeu Magalhães**

Departamento de Saúde Coletiva

Eduardo Henrique Gomes Rodrigues

**VALIDAÇÃO DE ABORDAGENS
MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO
DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA EM PERNAMBUCO.**

ORIENTADORES:

**Frederico Guilherme Coutinho Abath, M.D., M.Sc., PhD.
Maria de Fátima Militão de Albuquerque, M.D., M.Sc., PhD.**

Recife 2000

EDUARDO HENRIQUE GOMES RODRIGUES

**VALIDAÇÃO DE ABORDAGENS MOLECULARES
PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA EM PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Departamento de Saúde Coletiva – NESC do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/MS para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, área de concentração em Epidemiologia Molecular.

Orientadores: Frederico Guilherme Coutinho Abath, M.D., M.Sc., PhD.
Maria de Fátima Militão de Albuquerque, M.D., M.Sc., PhD.

RECIFE

2000

R696v Rodrigues, Eduardo Henrique Gomes.

Validação de abordagens moleculares para diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco/ Eduardo Henrique Gomes Rodrigues; orientadores: Frederico Guilherme Coutinho Abath, Maria de Fatima Militão de Albuquerque. _Recife, 2000.

88 f.: il., tabs., figs.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)-Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz-NESC/CPqAM/FIOCRUZ.

Inclui referências bibliográfica e anexos.

1. Leishmaniose tegumentar americana 2. Reação em cadeia por polimerase 3. Diagnóstico I. Abath, Frederico Guilherme Coutinho, (Orient.) II. Albuquerque, Maria de Fátima Militão (Orient.) III. Título

CDU (2.ed.) 616.993.161

Biblio/NESC



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
DEPARTAMENTO DE SAÚDE COLETIVA

ATA DOS TRABALHOS

Sessão Pública n.º: 008/00

Título da Dissertação: VALIDAÇÃO DE ABORDAGENS MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM PERNAMBUCO.

Aluna: EDUARDO HENRIQUE GOMES RODRIGUES

Orientador: Prof. Dr. FREDERICO GUILHERME COUTINHO ABATH

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. OCTÁVIO FERNANDES DA SILVA FILHO

1º Examinador

Profª. Dr.ª NILMA CINTRA LEAL

2º Examinador

Prof. Dr. FREDERICO GUILHERME COUTINHO ABATH

3º Examinador

A comissão Examinadora, indicada pela Coordenação de Pós-Graduação em Saúde Pública, nível Mestrado, conforme o que estabelecem o Regulamento Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FIOCRUZ e o Regulamento Específico do Curso de Mestrado em Saúde Pública do CPqAM, deu início aos trabalhos de avaliação da dissertação às 9 : 40 horas do dia 29 de setembro de 2000.

A apresentação da dissertação pelo(a) aluno(a) teve a duração de 30 minutos.

Em seguida promoveu-se a arguição pelos examinadores, na seguinte ordem:

1º Examinador(a):

Duração da arguição 10 minutos

Duração da defesa 11 minutos

2º Examinador(a):

Duração da arguição 20 minutos

Duração da defesa 20 minutos

3º Examinador(a):

Duração da arguição 5 minutos

Duração da defesa 6 minutos.

Encerradas as arguições e as defesas às 11 : 30 horas, a apresentação e a defesa da dissertação tiveram duração total de 1 horas e 50 minutos.

À Deus e aos meus Protetores que estão sempre comigo.

Ao meu pai LUIZ RODRIGUES pela confiança, dedicação, carinho e incentivo durante toda minha vida.

Sua voz me dizia muito.
Seu silêncio me dizia tudo.
Seu olhar me penetrava.
Seu calor me confortava.
Sua mão me acalmava.
Sua presença, minha existência.
Seu cheiro, saudade.
Saudade, eternidade...

Eduardo Henrique Gomes Rodrigues

Ofereço este trabalho a mamãe que sempre dedicou sua vida por mim.

EDNA GOMES RODRIGUES

(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fred Abath, a quem admiro pela sua sabedoria, competência, dedicação e profissionalismo, requisitos importantes de valiosa contribuição à minha formação científica e, a todo apoio, amizade, compreensão e confiança em meu trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fátima Militão, pela sua constante contribuição e sabedoria, essenciais ao desenvolvimento dessa pesquisa a quem tenho grande admiração, carinho e respeito pela sua dedicação ao trabalho.

À Pesquisadora Maria Edileuza, figura de estímulo, dedicação, amizade, compreensão e profissionalismo. Sua importância para o andamento dessa pesquisa foi essencial e ao mesmo tempo de grande descontração em momentos difíceis com toda cautela como observa o trabalho científico, sempre me incentivando desde o início.

Ao Diretor do CPqAM, Dr. Alexandre Bezerra de Carvalho, por permitir o desenvolvimento do estudo neste Centro de pesquisa.

À Dra. Yara de Miranda Gomes, Chefe do Departamento de Imunologia do CPqAM, pelo seu incentivo e estímulo durante a pesquisa.

Aos Drs. Eduardo Freese e Lia Giraldo pela competente atuação frente à coordenação do mestrado em saúde pública do NESCE e total apoio durante o curso.

À Dra. Mitzi Mendonça, da Clínica de Dermatologia da UFPE, pela valiosa contribuição com as biópsias, peça fundamental para realização da PCR, e desenvolvimento da pesquisa.

Ao Estatístico Wayner Souza, pela essencial atenção e apoio na elaboração estatística desse estudo.

Ao Pesquisador Roberto Werkhäuser, pelo total incentivo, disponibilidade na etapa do laboratório e amizade, sempre presente em todos os momentos.

Aos Patologistas Drs. Valdir Bandeira, Aurilene Bandeira e Eunice Santana responsáveis pelo estudo histopatológico e aos funcionários Íris Albuquerque, Inaldete Policarpo e Ismael Arcanjo pelo carinho com os pacientes e coleta do material.

Às Biólogas Érika Lima e Simone Marta, pela atenção no tratamento com as biópsias e meios de cultura e à Acadêmica Cristiane Vasconcelos pela sua colaboração na aquisição dessas biópsias na clínica e manipulação no laboratório.

Ao Pesquisador Sinval Brandão, pelo incentivo e apoio prestado no decorrer do trabalho.

Às Dras. Norma Lucena, Constancia Barbosa, Sílvia Montenegro e Helena Nagy pelos momentos de aprendizado e amizade.

À Luciana Abrantes, pela atenção e disponibilidade na revisão bibliográfica, Virgínia, Nalva, Irene e Conceição pela atenção e amizade.

Aos Funcionários do NESC: Paulo Lira, Janice, Débora, Mégine, Sara e demais membros pela atenção dispensada.

Aos Profissionais do Núcleo de Informação Científica e Coordenação (NICC) do CPqAM pelo constante apoio, colaboração e amizade.

À FACEPE pela bolsa de estudo concedida integralmente.

Aos colegas de minha turma do mestrado em saúde pública do NESC.

Aos Amigos do CPqAM: Valéria, Edeneide, Fábio Melo, Adílson Chaves, Marcílio, Ricardo, Mineo, Rosana, Lílian, Clarice, André, Rita Maria, Daniela, Kirte, Renata, Fábio Brayner, Luiz, Lânia, Wagner Passos, Rafael Guimarães, Rosineide, Isaac, Josival, Hélio, Roni, Raimundo, Lula, Diego, Veruska, Joelma, Janiele e Eduardo José pela atenção e amizade durante essa jornada.

Ao Biólogo e Amigo Orlando Pedreschi que desde o início esteve sempre presente incentivando e contribuindo para a elaboração desse trabalho.

Aos pacientes, que dentro de sua realidade de dor e agonia, contribuíram imensamente para realização deste estudo, parcela importante de colaboração à saúde pública brasileira.

A todos enfim, que direta ou indiretamente ajudaram no meu trabalho, o meu agradecimento sincero.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

CENEPI - Centro Nacional de Epidemiologia

CPqAM - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucléico)

dNTP - Desoxinucleotídeo Trifosfato

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FNS - Fundação Nacional de Saúde

HE - Hematoxilina & Eosina

IFI - Imunofluorescência Indireta

IRM - Intradermo Reação de Montenegro

kDNA - DNA do Cinetoplasto

LC - Leishmaniose Cutânea

LMC - Leishmaniose Mucocutânea

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

MS - Ministério da Saúde

NNN - Novy, McNeal & Nicole

NNNm - Novy, McNeal & Nicole, modificado por Usmaru

pb - Pares de Base

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA (DNA Polimórfico Amplificado Randomicamente)

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição)

RNA - Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucléico)

TAE - Trisbase, Ácido bórico, EDTA

TE - Tampão Trisbase, EDTA

Tris - Trishidroxiaminometano

tRNA - RNA transportador

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco

U - Unidades

UV - Ultra Violeta

VPN - Valor Preditivo Negativo

VPP - Valor Preditivo Positivo

WHO - World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Características dos doentes que se enquadraram na definição de caso de LTA.....	47
Tabela 2:	Sensibilidade e especificidade da PCR específica para o subgênero <i>Viannia</i> e da PCR gênero específica.....	48
Tabela 3:	Tabela de contingência mostrando a categorização dos indivíduos estudados aplicando-se a definição de caso de LTA.....	49
Tabela 4:	Resultados dos exames complementares dos doentes que se enquadravam na definição de caso de LTA.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Longos maxicírculos indicados por seta conectando duas redes formadas por minicírculos.....	21
Figura 2:	Diagrama da estrutura do minicírculo do kDNA de <i>Leishmania</i>	22
Figura 3:	Diagrama da classificação das diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	23
Figura 4:	Apresentação das equações utilizadas para calcular sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN).....	35
Figura 5:	Limiar de detecção usando primers específicos para o subgênero <i>Viannia</i>	51
Figura 6:	Limiar de detecção usando primers gênero específico.....	52
Figura 7:	Eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados a partir de primers específicos para o subgênero <i>Viannia</i>	53
Figura 8:	Eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados a partir de primers específicos para o gênero <i>Leishmania</i>	54
Figura 9 A:	Eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados a partir de primers específicos para o gênero <i>Leishmania</i>	55
Figura 9 B:	Autoradiografia mostrando os resultados de hibridização com sonda específica para o subgênero <i>Viannia</i> dos amplicons resultantes de PCR específica para o gênero <i>Leishmania</i>	55
Figura 10:	Valores de VPP e VPN da PCR específica para o subgênero <i>Viannia</i> para diferentes prevalências hipotéticas.....	56

RESUMO

O controle da leishmaniose depende da disponibilidade de métodos acurados e sensíveis para detecção das espécies de *Leishmania*. No presente estudo, duas abordagens moleculares foram avaliadas para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana (LTA) em pacientes provenientes de zonas endêmicas de Pernambuco. Uma delas era gênero específica, enquanto que a outra era específica para o subgênero *Viannia*. Os limiares de detecção de DNA foram determinados e a sensibilidade e especificidade calculadas, sendo subsequentemente comparadas com outros testes diagnósticos mais convencionais. O limiar de detecção de DNA da PCR específica para o subgênero *Viannia* foi de 10 fg de DNA total, enquanto que o limiar de detecção para a PCR gênero específica foi de 1 pg de DNA total. Para a definição de caso de LTA adotou-se a presença de critérios clínico-epidemiológicos, associados à positividade em pelo menos um dos seguintes testes: pesquisa direta, exame histopatológico e isolamento por cultura. Dessa forma dos 98 pacientes inicialmente diagnosticados com base puramente clínico-epidemiológica, 87 foram considerados casos de LTA, e utilizados para o cálculo da sensibilidade. Trinta e um pacientes com lesões cutâneas de outras etiologias foram incluídos como controles para o cálculo da especificidade. A PCR gênero específica foi positiva em 60/67 das biópsias de LTA, resultando em uma sensibilidade de 89,6%, enquanto que a PCR específica para o subgênero *Viannia* foi positiva em biópsias de 82/87 casos de LTA, resultando em uma sensibilidade de 94,3%. Contudo, essas diferenças não foram significantes. Esse dado associado a outros, sugere que apenas o subgênero *Viannia* tem participação como agente etiológico de LTA em Pernambuco. Ambas as PCRs demonstraram 100 % de especificidade. O diagnóstico através da pesquisa direta apresentou um percentual de positividade dentre os casos de LTA de 68,2%, o exame histopatológico 89,9%, o isolamento através de cultura 44,0% e a imunofluorescência indireta 81,3%. Visando a utilização em regiões endêmicas com poucos recursos foram realizados alguns experimentos preliminares bem sucedidos com PCR/hibridização com sondas não radioativas. Em conclusão, as abordagens

moleculares avaliadas mostraram alta sensibilidade e especificidade, permitindo uma delas o diagnóstico ao nível do subgênero *Viannia*. A simplificação dos procedimentos de coleta e processamento das amostras, e a preparação dos reagentes em laboratórios de referência podem transformar a PCR em uma tecnologia de custo aceitável para regiões subdesenvolvidas, fornecendo informações epidemiológicas relacionadas à identificação do parasita relevantes para o planejamento das medidas de controle.

ABSTRACT

The control of leishmaniasis depends on the availability of accurate and sensitive methods for the detection of *Leishmania* species. In the present study, two molecular approaches were evaluated for diagnosing American cutaneous leishmaniasis (ACL) in patients from endemic areas of Pernambuco State. One of the approaches is genus specific whereas the other is specific for the *Viannia* subgenus. The DNA detection limits were determined and the sensitivity and specificity calculated, for comparison with conventional diagnostic tests. The DNA detection limit of the PCR specific for the *Viannia* subgenus was 10 fg of total DNA, whereas this was 1 pg for the genus specific PCR. Diagnosis of ACL was performed on the basis of clinical-epidemiological criteria associated to positive reaction in at least one of the following tests: direct microscopy examination, histopathological examination and culture. Based upon these criteria, from the 98 patients initially diagnosed as ACL exclusively on clinical-epidemiological basis, 87 were considered ACL cases, and used for the sensitivity calculation. Thirty one patients with cutaneous lesion caused by other agents were included as controls for the calculation of specificity. The genus specific PCR was positive in 60/67 biopsies from LTA, resulting in a sensitivity of 89.6%, whereas the PCR specific for the *Viannia* subgenus was positive in 82/87 cases of LTA, resulting in a sensitivity of 94.3%. However, these differences were not significant. Taken together with other observations, these results suggest that the *Viannia* subgenus is the only causative agent of ACL in Pernambuco State. Both PCRs showed 100% specificity. The diagnosis by direct observation of the parasite, histopathological examination, culture and indirect immunofluorescence was positive in 68.2%, 89.9%, 44.0% and 81.3% of the LTA cases, respectively. Since working with non radioactive material is clearly more convenient in endemic underdeveloped regions, a few preliminary experiments were carried out with PCR/hibridization with cold probes. In conclusion, the evaluated molecular methods showed high sensitivity and specificity, one of them being able to detect the subgenus *Viannia*. The simplification of sample collection and processing, and in-house preparation of reagents can transform the PCR into a low-cost technology appropriate for use in situations of limited resources, providing epidemiological information

concerning the parasite identification that are relevant for the planning of control strategies.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 – INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Leishmaniose tegumentar americana: visão geral e diagnóstico.....	01
1.2. Diagnóstico e epidemiologia molecular de doenças infecciosas.....	07
1.3. Validação de marcadores diagnósticos.....	08
1.4. Diagnóstico de infecções parasitárias com base na detecção de ácido nucléico.....	11
1.4.1. Hibridização com sondas moleculares.....	11
1.4.2. PCR (polymerase chain reaction).....	12
1.5. O DNA do cinetoplasto (kDNA) como alvo para o diagnóstico molecular de <i>Leishmania</i>	14
1.6. Identificação molecular de gênero, subgênero, complexo e espécies de <i>Leishmania</i> em confrontação com outros testes: implicações para o diagnóstico e pesquisa epidemiológica.....	16
2 – OBJETIVOS.....	24
2.1. Geral.....	24
2.2. Específicos.....	24
3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	25

3.1. Desenho de estudo.....	25
3.2. Casuística.....	25
3.3. Definição de caso.....	26
3.4. Biópsia cutânea e exame histopatológico.....	26
3.5. Exames parasitológico.....	27
3.5.1. Pesquisa direta.....	27
3.6. Isolamento através de cultura.....	28
3.6.1. Cultivo <i>in vivo</i>	28
3.6.2. Cultivo <i>in vitro</i>	29
3.7. Exames imunológicos.....	29
3.7.1. Imunofluorescência indireta.....	29
3.8. Abordagens moleculares.....	30
3.8.1. Extração e purificação de DNA.....	30
3.8.2. Amplificação do DNA através de PCR.....	30
3.8.3. PCR específica para o subgênero <i>Viannia</i>	31
3.8.4. PCR gênero específica.....	31
3.8.5. Análise dos produtos da PCR.....	33
3.8.6. PCR seguida de hibridização com sondas específicas.....	33
3.9. Cálculo dos indicadores de eficiência dos testes diagnósticos e análise estatística.....	34
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1. Determinação do limiar de detecção de DNA de <i>Leishmania</i> pelas abordagens baseadas em PCR.....	37
4.2. Avaliação da sensibilidade e especificidade dos métodos baseados em PCR no diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana.....	39
4.3. Análise da pesquisa direta, exame histopatológico, isolamento por cultura e imunofluorescência indireta no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana.....	42
4.4. Experimentos preliminares para a utilização de hibridização com sonda fria após PCR no diagnóstico do subgênero <i>Viannia</i>	44

5 – CONCLUSÕES.....	57
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
7 – ANEXOS.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose tegumentar americana: visão geral e diagnóstico.

As leishmanioses são enfermidades causadas por várias espécies de protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* (Marzochi, 1992). Esses protozoários se apresentam com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e em alguns meios de cultura artificiais, e outra aflagelada ou amastigota, como é vista nos tecidos dos hospedeiros (ser humano e outros animais) (Ministério da Saúde, 1993). Nas Américas, as leishmanioses são transmitidas entre os animais e o homem pela picada das fêmeas de diversas espécies de flebotomos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus*.

As leishmanioses compreendem um espectro de doenças distribuídas mundialmente em regiões tropicais e subtropicais, cuja gravidade varia desde lesões cutâneas que tendem para autocura até graves lesões mucocutâneas mutilantes ou infecções viscerais. Com uma prevalência de 12 milhões de pessoas e uma incidência anual de 1 a 1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 casos de leishmaniose visceral, as leishmanioses afetam 88 países colocando 350 milhões de pessoas sob risco de adquirir a doença. Cerca de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão, enquanto que 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no

Afganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (WHO, 2000). No Brasil, a leishmaniose tegumentar americana (LTA), causada predominantemente por *Leishmania braziliensis* está amplamente distribuída desde o Sul da região amazônica até o Sudeste brasileiro (Arias et al., 1996; WHO, 2000). Essa espécie é o mais importante agente etiológico de LTA no Nordeste do Brasil. Estudos em áreas endêmicas de Pernambuco, através de inquéritos epidemiológicos de infecções e manifestações clínicas confirmaram um elevado risco de infecção, e um aumento de aproximadamente 10 vezes na transmissão durante os últimos 10 anos (Brandão-Filho et al., 1994). Apenas entre 1996 e 1998, foram registrados 2060 casos de leishmaniose tegumentar em Pernambuco (MS/FNS-CENEPI, 1997). A LTA incide em todas as regiões do Estado de Pernambuco, com focos epidêmicos em micro regiões do Agreste, na Zona da Mata, em municípios situados em regiões de Serras e Vales (Brito, 1998).

O diagnóstico da leishmaniose pode ser feito a partir de um conjunto de abordagens (Kar, 1995): (a) manifestações clínicas compatíveis associadas à procedência de uma área endêmica; (b) resposta à terapêutica específica; (c) exame microscópico de esfregaços da lesão; (d) detecção do parasita em material de biópsia, através de observação histológica de formas amastigotas ou através de cultura de amostras clínicas para a detecção de promastigotas; e) imunodiagnóstico (detecção de anticorpos específicos, detecção de antígenos parasitários e detecção de imunidade mediada por células). À esses critérios, apenas recentemente têm-se incorporado os métodos diagnósticos moleculares, tais como aqueles baseados na detecção do DNA do parasita, particularmente DNA de cinetoplasto (Singh et al., 1999; Rodriguez et al., 2000; Pirmez et al.,

1999; de Bruijn & Barker, 1992; Degraeve et al., 1994.). As abordagens moleculares visando o diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana serão comentadas em outra seção.

A LTA pode apresentar manifestações clínicas variadas (Barral & Pedral-Sampaio, 1991). A **leishmaniose cutânea** (LC) consiste em lesões ulceradas que podem apresentar-se de três formas: localizada, caracterizada pela lesão única; disseminada, contendo numerosas lesões em várias regiões do corpo e a forma difusa, que é nodular. As lesões ulceradas cutâneas, manifestam-se com quinze dias ou vários anos, após a picada do flebótomo infectado. Estas úlceras variam de tamanho podendo medir 0,25 cm a 3,0 cm de diâmetro. Classicamente a lesão tem bordos elevados, em moldura, fundo granulomatoso, com ou sem exsudação. Na forma difusa as lesões são papulosas ou nodulares, distribuem-se amplamente na superfície corporal, são deformantes e muito graves.

A **leishmaniose mucocutânea** (LMC) compreende as formas infiltrativas iniciais, ulcerosas, vegetantes e úlcero-vegetantes. Acomete a região nasofaríngea, laringe e cavidade oral. É de natureza metastática podendo ou não acompanhar os quadros cutâneos ou apresentar-se até 24 anos após a lesão inicial. O diagnóstico diferencial inclui outras doenças crônicas de lesões ulceradas ou não ulceradas tais como as úlceras traumáticas, as úlceras de estase, a úlcera tropical, úlceras de membros inferiores por anemia falciforme, piodermites, paracoccidiodomicose, esporotricose, lúpus vulgaris, sarcoidose, cromomicose cutâneas, sífilis, tuberculose cutânea, blastomicose, donovanose e epitelieomas. A hanseníase virchowiana deverá ser excluída, principalmente no diagnóstico diferencial da leishmaniose cutânea difusa. Nas lesões mucosas, o

diagnóstico diferencial deve ser feito com a paracoccidiodomicose, rinoscleroma, boubá, sífilis terciária, granuloma médio facial e neoplasias.

Como visto antes, os sinais e sintomas das diferentes formas de leishmaniose não são característicos e frequentemente são semelhantes aos de outras doenças. Embora somente os testes parasitológicos forneçam o diagnóstico de certeza, muitas vezes a escassez de parasitas na leishmaniose tegumentar torna difícil a detecção dos mesmos. Nessas circunstâncias, o diagnóstico é dado com base no conjunto de dados disponíveis sobre o caso.

Classicamente a detecção do parasita é feita pela observação direta através de preparados citológicos corados pelo Giemsa, que é um procedimento sensível e rápido podendo diagnosticar mais de 50% dos doentes com lesões recentes. Na leishmaniose tegumentar a demonstração das formas amastigotas pode ser feita por técnicas imunocitoquímicas em tecidos de lesão, em “imprints” do tecido ou aspirado de lesão colocado sobre papel de nitrocelulose. O exame histopatológico é utilizado como técnica diagnóstica para o estudo de processo ulcerativo desconhecido. A menos que se observe as formas amastigotas, os aspectos histopatológicos são frequentemente semelhantes aos de outras enfermidades dermatológicas inflamatórias ou granulomatosas. Dado que a sensibilidade do exame histopatológico é baixa devido à escassez de parasitas ou distorção dos amastigotas ao fixar o tecido, o exame histopatológico da biópsia de pele é muito mais útil para o diagnóstico diferencial, já que estabelece outras etiologias (Weigle et al., 1987).

Um dos métodos diagnósticos mais específicos para leishmaniose tegumentar americana consiste no isolamento do parasita em cultura a partir de

material obtido por punção aspirativa ou biópsia das lesões de doentes. Um outro método diagnóstico consiste em inocular animais susceptíveis, sendo o hamster o mais usado para o cultivo *in vivo* de aspirado ou homogenato de tecidos infectados. Além de ser falho, a cultura de biópsias requer pessoal e estrutura laboratorial especializados, não sendo adequada para rastreamentos epidemiológicos em grande escala. Existe muita discrepância quanto ao êxito deste procedimento e a positividade das culturas pode variar entre 13 a 90% (Cuba, Mardsen & Barreto, 1981; Weigle et al., 1987; Navin, Arana & de MÉRIDA, 1990). Entre os possíveis fatores que determinam esta variabilidade podem estar as diferenças nas técnicas utilizadas para obter as amostras, diferenças entre as populações de doentes e diferenças entre as espécies de leishmanias que se encontram em várias localizações geográficas.

A intradermorreação de Montenegro (IRM) é um dos testes mais utilizados no imunodiagnóstico, devido à sua sensibilidade e especificidade, apresentando-se positiva na grande maioria dos casos de LTA. Contudo, pode ser negativa nos casos em que as lesões são recentes (seis semanas ou menos) assim como nos casos de leishmaniose cutânea difusa (Marzochi et al., 1980; Shaw & Lainson, 1975). Entretanto em áreas de alta endemicidade é muito freqüente encontrar reatividade a esta prova na população, de tal forma, que esta não é útil no diagnóstico de lesão ativa. Apesar do teste cutâneo não distinguir infecções passadas das atuais, pode ser útil quando os parasitas são escassos nas lesões e no diagnóstico de visitantes em áreas endêmicas (Kar, 1995).

As reações sorológicas de imunofluorescência indireta (IFI) e o teste imunoenzimático “enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) são de utilidade

no diagnóstico de forma clínica de lesões extensas, múltiplas e nas lesões mucosas secundárias e primárias (Mendonça et al., 1988). No entanto, apresentam reações cruzadas com leishmaniose visceral e doença de Chagas (causadas por organismos próximos filogeneticamente). Quando promastigotas são utilizados como antígenos em IFI, reatividade cruzada entre espécies relacionadas (como *Trypanosoma cruzi*) e não relacionadas (*Mycobacterium tuberculosis*) pode ser observada (Camargo & Robonato, 1969; Matossian, Kurban & Malwk, 1975; Anthony, Christenson & Johnson, 1980).

A IFI não é facilmente adaptável a estudos soropidemiológicos de grande escala devido às limitações de disponibilidade de parasitas e microscópios de fluorescência. A IFI geralmente não tem sido muito eficiente no diagnóstico de leishmaniose cutânea, devido aos baixos níveis de anticorpos circulantes (Bryceson, 1970). No entanto, os níveis de anticorpos detectáveis por IFI são mais elevados nos casos de leishmaniose cutânea com múltiplas lesões (Menzel & Bienzel, 1978) sendo muito baixos nos casos de leishmaniose cutânea localizada (Shaw & Lainson, 1975). O teste de ELISA tem uma sensibilidade que se equipara à IFI, mas é mais conveniente para estudos epidemiológicos (Hommel et al., 1978). Recentemente, foi proposto um teste diagnóstico através de Western blot, em que alguns antígenos se destacaram como potencialmente relevantes para o diagnóstico de LTA (Brito et al., 2000). As provas imunológicas com base na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* são métodos indiretos que indicam o contato com o parasita, mas não indicam necessariamente a doença ativa. Nas formas severas a presença de lesões ativas características e os títulos

elevados de anticorpos contra *Leishmania* se consideram diagnósticos na falta de outros meios para demonstrar a presença do parasita (Kar, 1995).

1.2. Diagnóstico e epidemiologia molecular de doenças infecciosas.

A tentativa de definir a epidemiologia molecular muitas vezes tem resultado em controvérsia e polêmica, particularmente no meio médico, preocupado com excessivas subespecializações e com os limites da epidemiologia molecular (Ambrosene & Kadlubar, 1997). Contudo, essas discussões semânticas podem obscurecer o valor da epidemiologia molecular no entendimento das causas das doenças (Thompson, Constantine & Morgan, 1998). Uma maneira simples de entender a epidemiologia molecular consiste em defini-la em função das ferramentas que são disponibilizadas (laboratoriais e analíticas) de relevância preditiva ou diagnóstica, para que se possa utilizar com o intuito de melhor definir a etiologia de uma determinada doença.

Dessa forma, a epidemiologia pode utilizar técnicas moleculares para definir a doença e seus estágios pré-clínicos, para definir a exposição a agentes danosos e seus efeitos biológicos, e para identificar a presença de genes de susceptibilidade (Shpilberg & Et, 1998). No caso das doenças infecciosas, a epidemiologia molecular atua no intuito de: a) esclarecer as causas da doença, que incluem a identificação do agente infeccioso e os fatores de risco relacionados ao hospedeiro e ao ambiente envolvidos na transmissão, infecção e doença; b) elucidar as interações e inter-relacionamentos entre os organismos

infecciosos ao nível populacional (heterogeneidade), tanto dentro como fora do hospedeiro; e c) estudar como essas informações podem ser aplicadas ao controle das doenças (Thompson, Constantine & Morgan, 1998).

Em seu nível mais básico, técnicas moleculares podem ser desenvolvidas para detectar a presença de uma espécie de agente infeccioso. O desenvolvimento de testes (marcadores) diagnósticos é essencial em qualquer estudo epidemiológico. As vantagens e desvantagens dos ensaios moleculares serão comentadas mais adiante.

1.3. Validação de marcadores diagnósticos.

O processo de avaliação do desempenho de um teste diagnóstico depende diretamente de critérios diagnósticos previamente estabelecidos, ou seja do conhecimento prévio da presença ou ausência da doença. Esta indicação da “verdade” é denominada de “padrão-ouro”. Algumas vezes o teste é validado a partir da descrição nosológica e *“somente depois de definir clinicamente o que se quer encontrar será possível reconhecer indivíduos portadores da condição clínica procurada”* (Almeida Filho & Rouquayrol, 1992). Sendo assim, uma definição diagnóstica clínica pode ser utilizada como “padrão-ouro” para comparação de resultados de testes (Almeida Filho & Rouquayrol, 1992).

No presente, grande parte da pesquisa epidemiológica tem se ocupado da validação de testes utilizando marcadores biológicos, fase que necessariamente precede a sua utilização no diagnóstico etiológico, avaliação de riscos, prevenção e controle de doenças.

A validade de um marcador se refere ao grau com que ele indica a presença do evento de interesse. Para validar a utilização de um medida biológica, como um marcador, é necessário entender o relacionamento entre o marcador e o evento ou condição de interesse. Os marcadores biológicos podem ser validados no que se refere a eventos como doença, exposição a agentes danosos ou susceptibilidade à doenças (Schulte & Perera, 1993).

Geralmente a validação de marcadores biológicos, e mais particularmente marcadores diagnósticos de infecção, é realizada em amostragens relativamente pequenas em que os grupos em estudo são categorizados com relação ao evento de interesse. Dessa forma, as características do marcador são determinadas, permitindo a sua utilização em estudos de grandes populações. Focalizando mais especificamente as doenças infecciosas, para que um marcador diagnóstico seja considerado válido, ele deve indicar a presença do agente infeccioso e se correlacionar com outras características relevantes da doença infecciosa.

Uma das propriedades fundamentais dos testes diagnósticos é a sua validade que pode ser mensurada mediante o cálculo de sua sensibilidade, especificidade e valor preditivo (Feinstein, 1977). A validade de um teste diagnóstico é medida pela sua habilidade em categorizar corretamente as pessoas realmente doentes como positivas e as sadias como negativas para o teste (Hennekens & Buring, 1987). Assim, a sensibilidade de um teste diagnóstico é definida pela capacidade de determinada abordagem detectar indivíduos verdadeiramente doentes, enquanto que, a especificidade, é a capacidade do teste ser negativo, em indivíduos não doentes.

Outros indicadores são também importantes e abordam aspectos diferentes da validade de um teste diagnóstico. Estes são o valor preditivo positivo e valor preditivo negativo que expressam a probabilidade da doença estar presente ou ausente dado o resultado positivo ou negativo do teste. O valor preditivo positivo (VPP) de um teste é a probabilidade de um indivíduo que apresenta o teste positivo, seja realmente doente. O valor preditivo negativo (VPN) é a probabilidade do indivíduo não ter a doença quando o resultado do teste for negativo. Os valores preditivos sofrem influência de prevalência do evento/doença.

Nas condições de um ensaio para avaliação de um teste, dificilmente a proporção de casos entre os participantes da pesquisa coincide com a prevalência da condição/doença na população. A solução para este fato é calcular os valores preditivos corrigidos para cada prevalência possível, o que permite construir a “curva de desempenho do teste” (Almeida Filho & Rouquayrol, 1992). Assim, conhece-se a probabilidade de que cada resultado, positivo ou negativo, represente um indivíduo verdadeiramente com ou sem a doença, respectivamente.

Os ensaios para validação de testes diagnósticos são portanto etapas importantes para consolidação de procedimentos de saúde pública, na medida em que somente a partir daí é possível aplicar técnicas diagnósticas adequadas para estudos populacionais visando o “rastreamento” de indivíduos portadores de doenças em sua fase pré-clínica e outros propósitos diagnósticos.

1.4. Diagnóstico de infecções parasitárias com base na detecção de ácido nucléico.

Sequências específicas de DNA de agentes infecciosos, e mais particularmente parasitas, podem ser detectadas por duas categorias de abordagens: hibridização com sondas moleculares e PCR (polymerase chain reaction), que se encontram delineadas em seus aspectos conceituais e técnicos a seguir.

1.4.1. Hibridização com sondas moleculares.

Sondas de ácido nucléico consistem em segmentos de DNA ou RNA que foram marcados com enzimas, substratos antigênicos, substratos quimioluminescentes ou radioisótopos, e que podem se ligar com alta especificidade a sequências complementares de ácido nucléico. As moléculas marcadoras da sonda permitem que a hibridização seja visualizada. As sondas moleculares podem ser dirigidas ao DNA ou ao RNA, e podem conter desde 20 a milhares de bases nucleotídicas. A hibridização deve ser realizada em condições tais (composição da solução de hibridização, temperatura, etc.) que assegurem que a sonda hibridize pareando especificamente com a sequência de ácido nucléico alvo, complementar. Essas condições definem a estringência ou grau de especificidade de ligação da sonda molecular. O formato mais comum de hibridização é aquele em que o ácido nucléico alvo encontra-se sobre uma

superfície sólida, como membranas, ou mesmo lâminas microscópicas (hibridização *in situ*).

1.4.2. PCR (polymerase chain reaction).

Esse método permite a amplificação (replicação *in vitro*) de segmentos específicos de DNA a partir de oligonucleotídeos (primers) anelados especificamente nas margens da região alvo. A reação é dependente de DNA polimerase termoestável e se realiza ao longo de vários ciclos, cada ciclo consistindo tipicamente de :

- a) desnaturação a 94°C, etapa em que o DNA alvo é desnaturado, permitindo que as fitas de DNA se tornem acessíveis para o anelamento (hibridização);
- b) anelamento a 55°C, ocasião em que a mistura de reação é esfriada para permitir o anelamento dos primers às sequências alvos complementares;
- c) extensão a 72°C, etapa em que a DNA polimerase termoestável exerce sua atividade de síntese de DNA.

A PCR possibilita a amplificação de milhões de cópias da sequência alvo, permitindo que a mesma seja detectada diretamente através de eletroforese. As características inerentes à PCR fazem com que o método seja extremamente sensível e específico. Nesse sentido, em geral, é mais sensível que os métodos diagnósticos baseados na hibridização com sondas moleculares.

Para informações mais detalhadas sobre o uso da hibridização com sondas moleculares e PCR, como ferramentas para o diagnóstico de doenças infecciosas consultar Persing et al., (1993) e Singh (1997).

Em geral, o diagnóstico de infecção parasitária tem como base as manifestações clínicas, os antecedentes epidemiológicos e diversos métodos laboratoriais, em que os exames microscópicos se destacam. As principais vantagens das técnicas baseadas em detecção de DNA são a sensibilidade com que podem detectar patógenos e a rapidez com que a identificação do parasita pode ser feita. No caso de parasitas cuja identificação e implementação de terapia requerem cultura do organismo ou inoculação em animais, claramente o diagnóstico através de sondas moleculares ou PCR seria vantajoso. Por outro lado, quando a microscopia direta é suficiente para a identificação morfológica, e a quantidade de parasitas suficientemente alta, então as abordagens baseadas em detecção de DNA não apresentam vantagens, a não ser pela possibilidade de automação e processamento de um grande número de amostras (Weiss, 1995). Contudo, quando a quantidade de parasitas é pequena, os métodos moleculares, mais sensíveis, são preferíveis. Com relação ao diagnóstico baseado na detecção de anticorpos específicos, eles podem ser úteis como instrumento para “screening”, apesar de comumente haver dificuldades com reações cruzadas que comprometem a especificidade. Além disso, usualmente a sorologia não permite a discriminação entre infecção presente ou passada. Já os testes de detecção de DNA podem distinguir organismos morfológicamente ou antígenicamente similares, além do que os parasitas não precisam ser viáveis ou cultiváveis. Uma característica intrínseca aos métodos de detecção de DNA é que os mesmos

podem não detectar parasitas de uma mesma espécie contendo sequências nucleotídicas variantes (Weiss, 1995).

1.5. O DNA do cinetoplasto (kDNA) como alvo para o diagnóstico molecular de *Leishmania*.

Os tripanosomatídeos apresentam um DNA mitocondrial, conhecido como DNA do cinetoplasto (kDNA), situado numa porção especializada destes organismos unicelulares, na base do flagelo (Borst & Hoeijmakers, 1979). A estrutura básica e função do kDNA são essencialmente as mesmas para toda a ordem Kinetoplastida. O kDNA compreende uma estrutura única na natureza, representado por uma rede ou cadeia de DNA com milhares de círculos que estão topologicamente entrelaçados. Estes círculos são de dois tipos: os minicírculos e os maxicírculos. Existem milhares de pequenos círculos e poucas dúzias de maxicírculos. Ainda não está claro porque os tripanosomatídeos são os únicos eucariotos que possuem uma organização mitocondrial desse tipo. Contudo, sabe-se que os produtos de genes dos maxicírculos são os RNAs mitocondriais, um conjunto de tRNAs e subunidades dos complexos enzimático da membrana interna mitocondrial (Schatz & Mason, 1974). De qualquer maneira, a expressão de proteínas a partir de genes do maxicírculo é uma tarefa altamente complexa. Suas transcrições sofrem edição do RNA, um processo em que resíduos de uridina são adicionados ou deletados de posições precisas durante a transcrição para criar a sequência de leitura apropriada (Benne et al., 1986). Por outro lado, a função genética dos minicírculos parece estar relacionada à

codificação de pequenos RNAs guias que controlam a especificidade de edição do RNA (Sturm & Simpson, 1990).

Como membros da ordem Kinetoplastida, o kDNA de *Leishmania* compreende os maxicírculos com cerca de 20-40 kb, presentes em 30-50 cópias e os minicírculos com aproximadamente 850 pb e presentes em cerca de 10.000 cópias/célula (Barker & Butcher, 1983) (Figura 1). Uma comparação das sequências dos minicírculos de diferentes espécies de *Leishmania* revelou que existe uma região de aproximadamente 100-200 pb que é conservada, enquanto que as regiões restantes variam entre espécies (Figura 2). A região conservada contém a sequência 5´-GGGGTTGGTGTA-3´, denominada sequência universal do minicírculo, que se considera que esteja localizada na origem de replicação e perfeitamente conservada em todos os minicírculos sequenciados até o presente (Rodriguez et al., 2000). Essas propriedades fazem do kDNA um alvo potencialmente excelente para o diagnóstico de subgêneros e espécies de *Leishmania*. De fato, mesmos os minicírculos de um mesmo organismo não possuem sequências de DNA completamente similares, em vez disso, pertencem a diferentes classes de sequências (Rogers & Wirth, 1987). Portanto, a amplificação por PCR deste alvo, presente em múltiplas cópias permite a detecção de infecção leishmaniótica com muita sensibilidade. Vários pesquisadores relataram a detecção de DNA de *Leishmania* em diferentes amostras clínicas de doentes com leishmaniose visceral e cutânea (Singh et al., 1999; McCann, Eresh & Barker, 1999; Rodriguez et al., 2000; Rodgers, Popper & Wirth, 1990; Smyth et al., 1992; Ravel et al., 1995; Laskay et al., 1995; Momeni et al., 1996).

1.6. Identificação molecular de gênero, subgênero, complexo e espécies de *Leishmania* em confrontação com outros testes: implicações para o diagnóstico e pesquisa epidemiológica.

Vimos, com certo detalhamento, as características de alguns testes diagnósticos e as dificuldades para o diagnóstico das leishmanioses. Dessa forma, passamos a sinteticamente confrontar as abordagens moleculares com outros testes mais tradicionais, e destacar algumas aplicações em diagnóstico e epidemiologia.

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose é tradicionalmente feito através da identificação de amastigotas em amostras teciduais ou esfregaços, e cultura *in vitro* de parasitas presentes em biópsias, associadamente a teste cutâneo do tipo hipersensibilidade retardada. A pesquisa direta do parasita, ou o seu isolamento através de cultura não são testes muito sensíveis e o sucesso é variável (De Bruijn et al., 1993). Testes de base imune como ELISA, imunofluorescência indireta e o teste cutâneo de Montenegro não distinguem entre infecção presente e passada, podendo também haver reações cruzadas com outros patógenos. Além disso, são testes indiretos que não detectam infecções muito recentes. A identificação direta microscópica de leishmânias é rápida e fácil, mas não discrimina espécies e a sensibilidade é de apenas 60 a 65% (Cuba et al., 1986).

As leishmanioses humanas são causadas por cerca de 20 espécies de *Leishmania* (Figura 3). Algumas manifestações da doença possivelmente estão

associadas com a recorrência de infecções latentes após a cura das lesões primárias (Aebisher, Moody & Handman, 1993). Isso indicaria que os parasitas podem persistir mesmo em hospedeiros imunes. A persistência da leishmaniose major em camundongos foi confirmada através de PCR e métodos de cultura *in vitro*. Da mesma maneira, a persistência de parasitas foi confirmada em cicatrizes de pacientes curados clinicamente de LTA (Schubach et al., 1998; Mendonça, 1999). Dessa forma, é relevante o desenvolvimento de aplicações e abordagens que possam detectar o parasita com alta sensibilidade e diferenciar as várias espécies de *Leishmania* (Rodriguez et al., 1994). Além disso, a possibilidade de infecções mistas, contendo outros membros da ordem Kinetoplastida ou mais de uma espécie do gênero *Leishmania*, torna essencial a identificação taxonômica precisa em estudos de natureza diagnóstica e epidemiológica (Lainson & Shaw, 1972; Eresh, McCallum & Barker, 1994; Ibrahim et al., 1994).

Portanto, está claro que métodos acurados e sensíveis são necessários, no sentido de identificar de maneira correta as espécies de *Leishmania* e que também satisfaçam os seguintes critérios: i) identificação rápida e direta dos parasitas nos vetores, reservatórios e biópsias teciduais, particularmente biópsias de lesões recentes ou que cicatrizaram espontaneamente; ii) capacidade de distinguir diferentes espécies patogênicas e possibilidade de automação, permitindo a análise de um grande número de amostras e iii) facilidade de realização em áreas endêmicas (Rodriguez et al., 1994).

Nos últimos anos, observou-se um progresso significativo no desenvolvimento de técnicas úteis para o diagnóstico e estudos epidemiológicos

(Degraive et al., 1994; Morgan & Thompson, 1998; Bañuls, Hide, & Tibayrenc, 1999). Dentre essas abordagens, mencionaremos o desenvolvimento de anticorpos monoclonais para a identificação de espécies de *Leishmania* (McMahon-Pratt, Bennet & David, 1981), a utilização de fragmentos de kDNA como sondas moleculares que podem discriminar entre espécies (Arnot & Barker, 1981; Ashall & Milles, 1988; Barker & Butcher, 1983; Kennedy, 1984; Massambe & Mutinga, 1992; Rogers & Wirth, 1987; Wirth & McMahon-Pratt, 1982), e a avaliação de variabilidade intra-específica por RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Pacheco et al., 1990), análise de isoenzimas (Le Blancq, Schnur & Peters, 1986) e RAPD (random amplified polymorphic DNA) (Pogue et al., 1995). Apesar dessas técnicas serem altamente específicas, muitas requerem uma quantidade de parasitas que só podem ser obtidas de culturas e não são apropriadas para uso direto em espécimes clínicos. Além disso, são procedimentos que requerem várias etapas. Nesse contexto, a PCR com sua extraordinária sensibilidade, oferece novas possibilidades e alternativas para estudos clínicos e epidemiológicos em leishmaniose (de Bruijn & Barker, 1992; de Bruijn et al., 1993; Rodgers, Popper & Wirth, 1990; Wilson, 1995).

Com o avanço tecnológico na área da biologia molecular é possível a identificação de *Leishmania* em casos de doenças subclínicas e casos com poucos parasitas, contribuindo para o acompanhamento do tratamento e avaliação mais precisa da prevalência em áreas endêmicas. Foram descritos vários sistemas baseados em PCR e/ou hibridização que permitem a identificação dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (Barker, 1989; Rodgers, Popper & Wirth,

1990; de Bruijn & Barker, 1992; Grimaldi Júnior & Tehs, 1993; McCann, Eresh & Barker, 1999; Matsumoto et al., 1999; Rodriguez et al., 2000).

Devido a sua grande sensibilidade e potencial capacidade de distinguir entre infecções passadas e ativas, a PCR poderá futuramente se tornar uma ferramenta importante para o diagnóstico de infecções subclínicas e na avaliação da resposta terapêutica. Contudo, são abordagens que precisam ser validadas, particularmente em regiões onde as populações parasitárias não foram bem caracterizadas, haja vista que os métodos baseados em detecções de DNA podem não detectar parasitas contendo sequências nucleotídicas variantes.

No presente estudo, abordagens moleculares foram implantadas e avaliadas para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana (LTA) em doentes provenientes de zonas endêmicas de Pernambuco. Para os testes desenvolvidos utilizando a PCR foram calculados a sensibilidade, especificidade e valor preditivo, tendo como base para comparação a definição clínico-epidemiológica acrescida de pelo menos um teste parasitológico. Posteriormente comparou-se os testes derivados da PCR com outros testes diagnósticos mais convencionais.



Figura 1. Longos maxicírculos indicados por seta conectando duas redes formadas por minicírculos (Borst & Hoesijmakers, 1979). A barra horizontal representa 1 μ m.

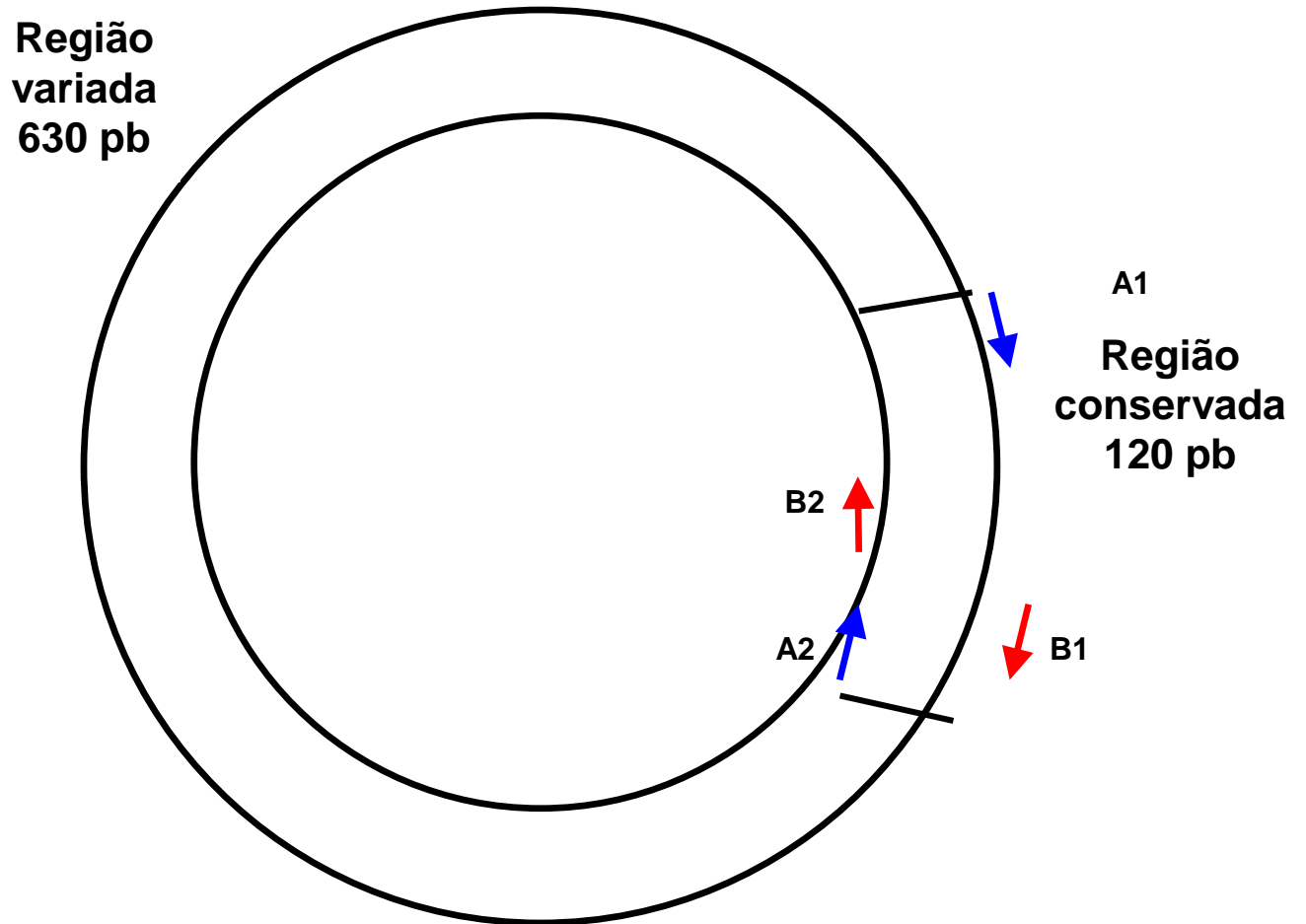


Figura 2. Diagrama da estrutura do minicírculo do kDNA de *Leishmania*. O kDNA pode ser utilizado como alvo para amplificação por PCR. A1/A2 e B1/B2 representam pares possíveis de primers.

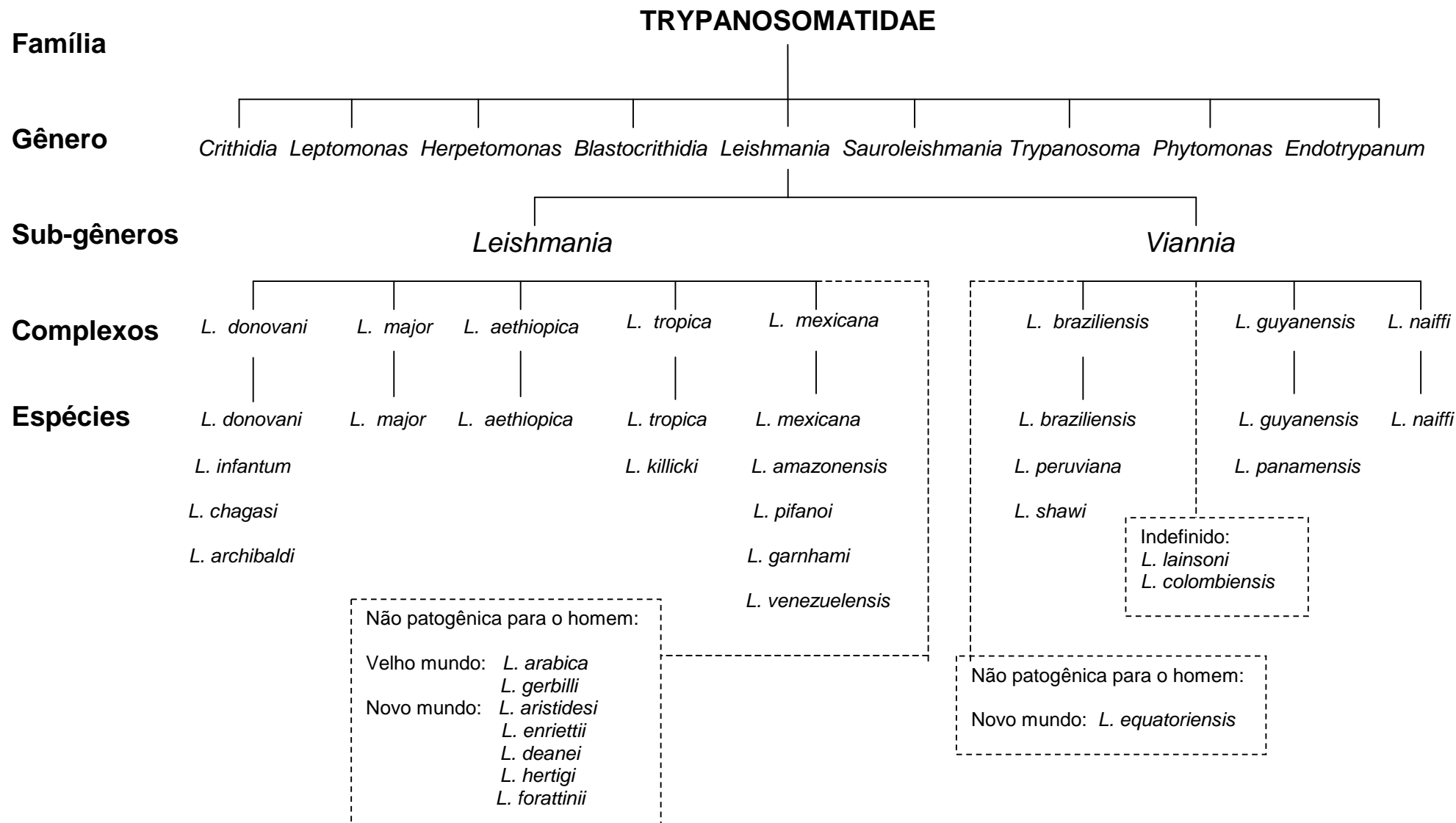


Figura 3. Diagrama da classificação das diferentes espécies de *Leishmania* (WHO, 1990), modificado por Topley & Wilson's, 1998.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estabelecer e avaliar o desempenho dos métodos moleculares gênero específico para *Leishmania* e subgênero específico para *Viannia* no diagnóstico de LTA em doentes oriundos de zonas endêmicas de Pernambuco.

2.2. Específicos

1. Avaliar o limiar de detecção de dois métodos diagnósticos derivados da PCR.
2. Calcular a sensibilidade e especificidade de dois métodos diagnósticos de LTA baseados na técnica de PCR e efetuados mediante biópsias cutâneas, comparando-os com o desempenho de métodos mais convencionais de diagnóstico.
3. Comparar a sensibilidade e especificidade dos dois métodos baseados na técnica de PCR.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Desenho de estudo

Realizou-se um estudo descritivo, tipo série de casos com um grupo de comparação como forma de avaliar o desempenho de métodos moleculares para o diagnóstico de LTA em regiões endêmicas do Estado de Pernambuco.

3.2. Casuística

Analizou-se mediante técnicas de PCR, 98 biópsias cutâneas referentes a indivíduos com o diagnóstico clínico-epidemiológico de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e 31 biópsias referentes a doentes com lesões cutâneas de outras etiologias, que consistiram em nosso grupo controle. Os doentes com LTA foram provenientes do município de Amaraji e distritos vizinhos, considerados áreas endêmicas da Zona da Mata de Pernambuco, com características eco-epidemiológicas conhecidas (Brandão-Filho et al., 1994). Esta região apresenta uma das maiores incidências de casos humanos de leishmaniose tegumentar americana no Estado de Pernambuco. A grande maioria dos indivíduos com LTA procuraram espontaneamente o posto médico local, e após o exame clínico foram encaminhados para o Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e para o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM – FIOCRUZ). Esses indivíduos foram examinados e acompanhados clinicamente

pela Equipe do Prof. Márcio Lobo Jardim, no Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da UFPE.

O projeto dentro do qual este trabalho se insere foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da UFPE e pela comissão de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ.

3.3. Definição de caso

A definição de caso de leishmaniose tegumentar americana baseou-se em um conjunto de critérios:

1. presença de lesões tegumentares típicas, antecedentes epidemiológicos compatíveis, e resposta clínica favorável à quimioterapia específica;
2. presença adicional de positividade em pelo menos um dos testes diagnósticos seguintes: pesquisa direta do protozoário na lesão, exame histopatológico ou isolamento do parasita através de cultura.

3.4. Biópsia cutânea e exame histopatológico

As biópsias cutâneas foram realizadas através de “punch” de 4 a 8 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% com felipressina. Todas as biópsias foram realizadas, no Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da UFPE e as amostras obtidas divididas em diversos fragmentos para:

esfregaço tipo “imprint”, exame histopatológico, cultura *in vivo* e *in vitro*, e PCR. Para PCR, as amostras eram processadas após estocagem a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O fragmento de biópsia para estudo histopatológico foi fixado em formol a 10%. Os cortes obtidos em micrótomo rotativo foram corados pela Hematoxilina & Eosina (HE) e pelo Giemsa, para serem examinados através de microscopia óptica.

3.5. Exames parasitológicos

3.5.1. Pesquisa direta

A pesquisa direta foi realizada após raspagem com lâmina de bisturi estéril da superfície da lesão não ulcerada e da borda da lesão ulcerada, tratadas antissepticamente. Os esfregaços foram feitos em lâminas com o material coletado, fixados com álcool metílico e corados pelo Giemsa. Os parasitas foram visualizados através de microscopia óptica.

3.6. Isolamento através de cultura

3.6.1. Cultivo *in vivo*

O material biopsiado foi colocado em microtubos e mantido em gelo até ser processado sob condições estéreis. Parte do fragmento de biópsia, foi estocado à temperatura do nitrogênio líquido (-196°C) para outros testes. A outra parte da biópsia foi lavada três vezes com salina contendo antibiótico e, em seguida, macerada e homogeneizada em 1000 µl da mesma solução. Quinhentos (500) µl, desse homogenato foram utilizados para o procedimento de cultivo *in vivo*, sendo inoculado na pata posterior e no peritônio de hamsters. Após o período de três meses, estes animais foram sacrificados para a obtenção de fragmentos da pata, do baço e do fígado na possibilidade de recuperação do parasita, através da inoculação de amostras em meio NNN/Schneider. O baço desses animais foi utilizado para se fazer “imprints”, que juntamente com lâminas de esfregaço sanguíneo foram fixadas e coradas utilizando o método de Giemsa, para visualização microscópica. Um volume adicional do homogenato (500 µl) foi utilizado para cultivo *in vitro* (Evans, 1989).

3.6.2. Cultivo *in vitro*

Para o cultivo *in vitro* utilizou-se homogenato de material biopsiado descrito anteriormente em cultivo *in vivo*. Quinhentos microlitros (500 µl) do homogenato foram adicionados a um tubo de meio de cultura NNNm (meio modificado Usmaru), (Walton, Shaw & Lainson, 1977), contendo as seguintes fases:

- (a) fase sólida composta de 4,0g de Bacto Blood Agar Base (DIFCO), diluído em 100 ml de água destilada e
- (b) fase líquida, obtida da condensação durante o resfriamento do agar. Após o período de três dias, os tubos foram observados e subsequentemente repicados de 5 em 5 dias por aproximadamente dois meses (Evans, 1989).

3.7. Exames imunológicos

3.7.1. Imunofluorescência indireta

A IFI foi utilizada para a detecção de anticorpos circulantes específicos contra *Leishmania* sp. em soros humanos, essencialmente de acordo com Camargo (1966). Foi utilizado o Kit IFI-Leishmaniose humana, produzido por Bio-Manguinhos-FIOCRUZ, seguindo as instruções do fornecedor. Foram utilizados dois soros padrões (positivos e negativos) na diluição de 1:40, tendo sido considerado positivos aqueles que resultaram em fluorescência das leishmanias nas lâminas a uma diluição sérica de 1:40.

3.8. Abordagens moleculares

3.8.1. Extração e purificação de DNA

A purificação de DNA das biópsias cutâneas foi realizada com o GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit[®] (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden), seguindo as instruções do fornecedor. Para cada purificação foi utilizado aproximadamente 20 mg de biópsia. Após precipitação do DNA genômico, o “pellet” foi ressuspendido em 100 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e estocado a -20°C. Dois µl foram usados na reação de PCR.

3.8.2. Amplificação do DNA através de PCR

O DNA contido nas amostras biopsiadas foi submetido a amplificação em um termociclador automático (Perkin Elmer, modelo 4800) sob condições dependentes do sistema de PCR utilizado. Um dos sistemas de PCR permitia a amplificação de kDNA de parasitas pertencentes ao subgênero *Viannia* (de Bruijn & Barker, 1992) enquanto o outro sistema de PCR empregava primers que amplificavam com especificidade para o gênero *Leishmania*. No último sistema, é possível através de hibridização subsequente com sondas apropriadas distinguir grupos de *Leishmania* (Schubach et al., 1998), embora, no presente estudo, isso tenha sido feito em número limitado de indivíduos.

3.8.3. PCR específica para o subgênero *Viannia*

Nessa PCR foram utilizados os primers 5'-GGGGTTGGTGTAATATAGTGG-3' e 5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3' (de Bruijn & Barker, 1992). A PCR foi realizada em um volume final de 25µl contendo Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, gelatina 0,1mg/ml, MgCl₂ 1,5mM, dNTP 0,2 mM, 25 µmoles de cada um dos primers e 2,5 U de Taq DNA Polimerase. A essa mistura eram adicionados 2 µl da amostra a ser analisada e o conteúdo do tubo era coberto com óleo mineral leve. A amplificação consistiu de 35 ciclos: 94°C (1 min), 65°C (1 min) e 72°C (1 min), precedidos de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C.

3.8.4. PCR gênero específica

Na PCR gênero específica, foram utilizados as seguintes sequências nucleotídicas: 5'- (G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3' e 5'-GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3' (Schubach et al., 1998). A PCR foi realizada em um volume final de 25µl contendo Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, gelatina 0,1mg/ml, MgCl₂ 1,5mM, dNTP 0,2mM, 25 µmoles de cada um dos primers e 2,5 U de Taq DNA Polimerase. A essa mistura foram adicionados 2 µl da amostra a ser analisada e o conteúdo do tubo foi coberto com óleo mineral leve. A amplificação consistiu de 30 ciclos: 94°C (30 s), 50°C (30 s) e 72°C (30 s), precedidos de uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C.

Como forma de minimizar o risco de contaminação da PCR com os

produtos amplificados, um fluxograma de trabalho foi elaborado a fim de evitar a interação entre as áreas de pré-amplificação e pós-amplificação. Além disso, dois controles negativos (sem DNA) foram incluídos a cada preparação de novas reações juntamente com dois controles positivos com 100 µg e 10 µg de DNA genômico de *Leishmania (V.) braziliensis* (controles de contaminação e controle de sensibilidade da PCR, respectivamente).

3.8.5. Análise dos produtos da PCR

Dez µl dos produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,0% para o alvo de 750 pb e 1,5% para o alvo de 120 pb com tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM) corados pelo brometo de etídeo (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989). As bandas de DNA separadas eletroforeticamente foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta e fotografados com um sistema de documentação polaróide (MP4+ system).

3.8.6. PCR seguida de hibridização com sondas específicas

A abordagem foi realizada em número limitado de amostras (11 doentes portadores de LTA e 4 doentes com lesões cutâneas não leishmanióticas). Os amplicons produzidos pela PCR gênero específica foram previamente separados

em eletroforese num gel de agarose, sendo esses fragmentos de DNA transferidos para uma membrana de nylon para posterior hibridização com o uso de sondas marcadas não radioativamente.

Transferência a vácuo.

O gel de agarose após a corrida eletroforética foi tratado com uma solução de desnaturação (NaCl 1,5M e NaOH 0,5M) por 7 min, em seguida com uma solução de neutralização (Tris 1,0M e NaCl 1,5M) por 7 min, e finalmente tratado com uma solução de transferência (20x SSC) por 30 min, num equipamento de blotagem à vácuo (VacuGene™XL Vacuum blotting System, Pharmacia Biotech) sob pressão negativa de 50 mbar. Em seguida, as bandas de DNA foram transferidas a vácuo para uma membrana de nylon (GeneBind 45 nylon, Pharmacia LKB Biotechnology) em contato direto com o gel de agarose.

Hibridização.

Após a fixação das bandas de DNA à membrana de nylon através de “crosslinking” com UV (realizado com o aparelho Ultraviolet Crosslinker da Hoefer) a sonda (DNA clonado de minicírculo de *L. (Viannia) panamensis*), específica para o subgênero *Viannia* (Pirmez et al., 1999) foi marcada com fosfatase alcalina, e a hibridização e visualização por quimioluminescência realizadas exatamente de acordo com os protocolos fornecidos para o Kit AlkPhos direct (Amersham Pharmacia Biotech). As autoradiografias foram realizadas com filme ortocromático BIOMAX MR da Kodak, e a revelação com Dektol.

3.9. Cálculo dos indicadores de eficiência dos testes diagnósticos e análise estatística.

Utilizando-se a definição de caso de LTA descrita no item 3.3 como “padrão ouro” para estabelecer a presença ou ausência de doença calculou-se a sensibilidade e especificidade dos dois testes diagnósticos baseados na PCR com seus respectivos intervalos de confiança de 95%. A sensibilidade e a especificidade dos testes diagnósticos foram calculados de acordo com Feinstein (1977) (Figura 4). Os VPP e VPN foram calculados para prevalências hipotéticas que variavam de 0,7 até 0,00001 (Feinstein, 1977). Comparou-se a sensibilidade e especificidade dos 2 testes utilizando o χ^2 estabelecendo-se 5% ($p=0,05$) como limiar de significância.

Utilizou-se o Programa EPI-INFO 6.04b para construção de um banco de dados contendo informações sobre os casos de LTA e controles como também para a análise dos dados.

Teste	Doença presente	Doença ausente
Positivo	positivos verdadeiros a	Positivos falsos b
Negativo	negativos falsos c	Negativos verdadeiros d
Total	a + c	b + d
Sensibilidade = $\frac{a}{a + c}$		Especificidade = $\frac{d}{b + d}$
VPP = $\frac{a}{a + b}$		VPN = $\frac{d}{c + d}$

Figura 4. Apresentação das equações utilizadas para calcular sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O risco de disseminação das leishmanioses na atualidade deve ser considerado. O aumento do turismo em regiões endêmicas para essa doença e a possibilidade de agravamento e reativação da doença em condições de imunossupressão, como acontece na AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) já foram amplamente divulgadas (Fichoux et al., 1999; Czechowicz et al., 2000).

Como as manifestações clínicas das leishmanioses algumas vezes não são características, mesmo em regiões geográficas onde a doença é endêmica, faz-se necessário o diagnóstico diferencial com outras doenças também comuns no Brasil, tais como carcinoma epidermóide, e lesões causadas por *Paracoccidioides braziliensis*, tuberculose, sífilis e lepra (Pirmez et al., 1999). Também deve-se apreciar que a discriminação de espécies é importante em regiões onde a leishmaniose pode ser causada por mais de uma espécie de *Leishmania*.

No Brasil, seis espécies têm sido descritas como agentes etiológicos de LTA (Marzochi & Marzochi, 1994). A *L.(V.) braziliensis* é encontrada em todo o país e causa úlceras cutâneas e mucosas. A *L.(V.) guyanensis* causa principalmente lesões cutâneas e ocorre ao norte da região amazônica. As outras espécies do subgênero *Viannia*, *L.(V.) lainsoni*, *L.(V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* são praticamente restritas ao ciclo silvestre na região amazônica. A *L. (L.)*

amazonensis é a única espécie do subgênero *Leishmania* que causa lesões cutâneas, tendo sido identificada no Nordeste, Sudeste e Centro oeste do Brasil.

Soma-se à toda esta diversificação de espécies e manifestações clínicas, o fato dos testes diagnósticos convencionais apresentarem limitações, como já foi apresentado com certo detalhamento na Introdução deste trabalho. Levados esses fatos em conta, fica clara a necessidade de desenvolvimento e validação de testes diagnósticos mais sensíveis e com maior acurácia.

4.1. Determinação do limiar de detecção de DNA de *Leishmania* pelas abordagens baseadas em PCR.

O sistema de PCR baseado em de Bruijn & Barker (1992) é específico para o subgênero *Viannia* e amplifica um produto de 750 pb. No presente estudo, o limiar de detecção de DNA de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75-2903) foi de 10 fg de DNA total (Figura 5), enquanto que o limiar de detecção reportado por de Bruijn & Barker (1992) foi de 1 fg de kDNA. O tamanho do genoma haplóide dos 36 cromossomos de *Leishmania* foi estimado em 35 Mb (Wincker et al., 1996), portanto, o genoma diplóide contém 70 Mb de DNA cromossomal. O DNA total, incluindo cerca de 10 Mb de kDNA (aproximadamente 10% do DNA total) é estimado em 80 Mb, que equivale a 88 fg de DNA por célula (Fu, Perona-Wright & Barker, 1998). Dessa forma, o limiar de detecção observado no presente estudo é compatível com o reportado na literatura (de Bruijn & Barker, 1992), podendo o

método detectar uma quantidade de DNA equivalente a menos de um parasita por tubo de reação. Este fato é bastante promissor para o estudo de LTA visto que diante de lesões muitas vezes com poucos parasitas é importante dispormos de um teste com alta sensibilidade.

Na eletroforese, muitas vezes amplicons de peso molecular >750 pb foram observados (Figura 5), tendo sido interpretados previamente como produtos de minicírculos polimerizados além do sítio dos primers (“readthrough products”), e dependentes da quantidade de DNA alvo (de Bruijn & Barker, 1992).

O outro sistema de PCR com que trabalhamos se baseia em uma amplificação do kDNA a partir de primers específicos para o gênero *Leishmania*, produzindo um fragmento de 120 pb (Schubach et al., 1998). A identificação de grupos ou complexos do parasita pode ser feita através de hibridização do produto de amplificação com sondas específicas (Degraeve et al., 1994). No nosso estudo o limiar de detecção para essa PCR foi de 1 pg de DNA total de promastigotas (Figura 6). Bandas não específicas >120 pb foram produzidas, que possivelmente poderiam ter sido evitadas através de procedimentos que diminuíssem os anelamentos não específicos (por exemplo, o “hot start”). Algumas bandas inespecíficas se originaram a partir do DNA do hospedeiro, como sugere o experimento de hibridização com sonda específica (Figura 9).

As razões para a diferença observada no presente trabalho entre os limiares de detecção para a PCR complexo específica e a gênero específica não são claras. Para uma mesma quantidade de moles produzida sabe-se que fragmentos de maior peso molecular incorporam mais brometo de etídeo (utilizado para

visualização das bandas de DNA em eletroforese), explicando o aparecimento de bandas mais intensamente fluorescentes quando da produção de amplicons de maior peso molecular. Além disso, é possível que os diferentes primers utilizados nas PCRs apresentem diferentes eficiências de anelamento ao DNA alvo.

4.2. Avaliação da sensibilidade e especificidade dos métodos baseados em PCR no diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana.

A definição de caso de LTA incluiu doentes que além de atenderem a critérios clínico-epidemiológicos, apresentavam positividade a pelo menos um dos seguintes testes convencionais: pesquisa direta, exame histopatológico e isolamento por cultura. Procedendo dessa forma, dos 98 doentes que apresentavam lesões dermatológicas inicialmente diagnosticados como LTA com base clínico-epidemiológica, 87 puderam ser enquadrados como caso de LTA, e utilizados para o cálculo da sensibilidade, enquanto que 11 foram considerados suspeitos. Houve apenas 1 caso de leishmaniose mucocutânea, enquanto que 86 eram casos de leishmaniose cutânea (um deles com a forma disseminada). Como pode ser observado na Tabela 1, houve predominância de casos do sexo masculino (74,7%), na faixa etária de 10 a 29 anos (57,5%), e no desempenho de atividade agrícola (69%). Isso sugere que esses indivíduos estejam mais expostos ao risco de infecção, através de uma maior proximidade do vetor e possíveis reservatórios. Nesse sentido, existem estudos preliminares implicando

os roedores silvestres como os principais reservatórios em zonas endêmicas de Pernambuco (Brandão-Filho et al., resultados não publicados).

A PCR descrita por de Bruijn & Barker (1992), capaz de identificar infecções causadas por parasitas do subgênero *Viannia* foi positiva em 82/87 doentes, resultando em uma sensibilidade de 94,3% (Tabela 2). A PCR descrita em Schubach et al. (1998) detectou DNA específico em 60/63 dos doentes, resultando em uma sensibilidade de 89,6%.

Em outra etapa de análise, comparamos as sensibilidades das duas PCRs e verificamos que a diferença entre as mesmas não foi significativa ($p > 0,05$). As sensibilidades para os diagnósticos baseados em PCR têm variado de 85 a 100%, enquanto que esses métodos sempre têm-se mostrado bastante específicos em condições operacionais adequadas (de Bruijn et al., 1993; Aviles et al., 1999; Belli et al., 1998). Dos 87 casos de LTA estudados foi possível o isolamento e caracterização do parasita através da análise de anticorpos monoclonais e isoenzimas em 24 doentes (Brito et al., resultados não publicados). Todas as amostras isoladas foram caracterizadas como *L. braziliensis* serodema 1. Entretanto, 5 variantes do zimodema referência foram identificadas (Brito et al., resultados não publicados), confirmando a existência de novas variantes de *L. (V.) braziliensis* em Pernambuco como já havia sido demonstrado previamente (Brito et al., 1993). As evidências até o presente indicam que apenas o subgênero *Viannia* tem participação como agente etiológico de LTA em Pernambuco.

Os resultados do presente estudo confirmam isso, apesar de não termos formalmente excluído a possibilidade de infecções ou co-infecções com outras leishmânias dermatrópicas. Nessa direção, Passos et al. (1999), utilizando PCR-hibridização identificaram *L. (V.) braziliensis* como a espécie predominante causando LTA em Minas Gerais. Contudo, *L. (L.) amazonensis* foi detectada em 7,5% dos casos.

A disponibilização de testes moleculares para o diagnóstico de doenças infecciosas, trouxe novas questões a respeito da avaliação estatística dos novos testes, decorrentes de sua elevada sensibilidade em comparação aos testes convencionais (Mc Adam, 2000). Nesta situação podemos nos deparar com um “paradoxo”. Se o novo teste for mais sensível que o padrão-ouro utilizado, um determinado número de doentes diagnosticados pelo novo teste poderão ser considerados falso-positivos sem o serem. No nosso estudo, a PCR descrita por de Bruijn & Barker (1992) detectou os 11 casos tidos como não doentes pelo padrão-ouro, enquanto que a PCR descrita em Schubach et al. (1998) foi positiva em 5 desses indivíduos (Tabela 3). Devido à alta sensibilidade e especificidade da PCR provavelmente estes doentes são leishmanióticos.

A especificidade dos métodos foi calculada a partir de um grupo de comparação composto por indivíduos com doenças cutâneas variadas, de natureza não leishmaniótica, que se submeteram a biópsia para elucidação do diagnóstico. Foram excluídos do cálculo, os 11 indivíduos que, apesar de não se enquadrarem em nossa definição de caso, apresentavam fortes evidências

clínico-epidemiológicas de LTA, o que levaria a especificidade subestimadas (Tabela 3). Ambas as PCRs resultaram em 100% de especificidade (Tabela 2).

A amostra utilizada neste trabalho não reflete a prevalência nas áreas endêmicas. Dessa forma com fins ilustrativos, o VPP e o VPN da PCR específica para o subgênero *Viannia* foram calculados para prevalências hipotéticas, permitindo a construção de uma curva do desempenho do teste na população alvo (Figura 10). Isso permitiria se ter uma idéia dos valores preditivos para determinada população de área endêmica.

Os primers propostos por de Bruijn & Barker, (1992) foram baseados em isolados de referência para a Organização Mundial de Saúde, sendo importante a demonstração experimental de que, podem ser utilizados em diferentes regiões do mundo, e em diferentes regiões do Brasil (Bruijn et al., 1993). No presente estudo, demonstramos que podem ser utilizados para o diagnóstico de LTA em doentes oriundos de zonas endêmicas de Pernambuco. As figuras 7 e 8 mostram alguns resultados representativos das abordagens moleculares utilizadas.

4.3. Análise da pesquisa direta, exame histopatológico, isolamento por cultura e imunofluorescência indireta no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana.

Dentre os casos de LTA, o diagnóstico através da pesquisa direta apresentou um percentual de positividade de 68,2%, o exame histopatológico 89,9%, o

isolamento através de cultura 44,0% e a imunofluorescência indireta 81,3% (Tabela 4). Vale salientar que a sensibilidade da PCR foi significativamente maior que os percentuais de positividade da pesquisa direta e do isolamento através de cultura ($p < 0,05$).

O percentual de positividade do exame histopatológico está superestimado como indicativo da presença de parasitas, já que sua positividade foi definida com base à sua compatibilidade com o diagnóstico clínico-epidemiológico, e não necessariamente com a presença de amastigotas. De fato, o exame histopatológico possui sensibilidade limitada, tendo mais utilidade no diagnóstico de patologias não leishmanióticas do que como instrumento diagnóstico primário para leishmaniose (de Bruijn et., 1993). Em se tratando da imunofluorescência indireta (IFI) apenas a sensibilidade da PCR específica para o subgênero *Viannia* mostrou-se significativamente maior que o da IFI ($p < 0,05$). Além das limitações relacionadas a reações cruzadas e discriminação de infecções ativas e passadas em áreas endêmicas, o valor dos testes sorológicos na LTA é pequeno devido aos baixos títulos de anticorpos específicos. Entretanto, já foi demonstrado que o imunodiagnóstico baseado em Western blot é bem mais sensível que outros testes sorológicos (Brito et al., 2000). Dessa forma, de maneira geral, os resultados descritos no presente trabalho confirmam que o diagnóstico através de PCR é mais sensível que os outros métodos, tais como pesquisa direta, isolamento através de cultura e imunofluorescência indireta (de Bruijn et al., 1993; Aviles et al., 1999.)

4.4. Experimentos preliminares para a utilização de hibridização com sonda fria após PCR no diagnóstico do subgênero *Viannia*.

A utilização de hibridização após PCR tem sido descrita como uma forma para aumentar a sensibilidade e especificidade desta técnica. De fato, vários estudos foram publicados mostrando que a identificação de subgêneros e mesmo espécies de *Leishmania* é possível dessa forma. Por exemplo, através da hibridização com sondas correspondentes a minicírculos clonados de *L. panamensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi* é possível classificar as leishmânias em três grupos de espécies: dermatrópicas (subgênero *Viannia*), dermatrópicas (subgênero *Leishmania*) e viscerotrópicas (complexo *L. chagasi*) (Degraeve et al., 1994; Passos et al., 1999; Pirmez et al., 1999). Contudo, a maioria desses estudos tem utilizado sondas marcadas com material radioativo (Passos et al., 1999; Pirmez et al., 1999), o que é inconveniente em zonas endêmicas para leishmaniose, pois esse material é caro e difícil de descartar. Sendo assim, adaptamos a abordagem utilizada por Schubach et al. (1998), para que pudesse ser utilizada com sondas marcadas com nucleotídeos não radioativos. Foram analisados 11 doentes com LTA e 4 com outras doenças cutâneas de etiologia não leishmaniótica através de PCR-hibridização não radioativa (Figura 9). Como demonstrado nesta figura, a banda diagnóstica foi reconhecida por hibridização em todos os doentes, mas em nenhum controle negativo. Em algumas amostras, bandas >120 pb foram amplificadas. A análise da hibridização mostra que a maioria desses produtos são originários de DNA não relacionado ao kDNA,

possivelmente do hospedeiro humano. Contudo, alguns produtos >120 pb hibridizam com a sonda indicando que são relacionados aos minicírculos.

Apesar de termos utilizado o procedimento de PCR-hibridização com sonda fria (não radioativa) em um pequeno número de amostras, claramente os resultados são encorajadores e merecem atenção, pois a abordagem é bem mais apropriada para uso em regiões endêmicas e subdesenvolvidas.

A simplificação dos procedimentos de coleta e processamento das amostras, e a preparação dos reagentes em laboratórios de referência podem transformar a PCR em uma tecnologia de custo aceitável para utilização em regiões endêmicas com poucos recursos (Belli et al., 1998). Não é muito fácil obter biópsias de doentes em áreas endêmicas, devido aos inconvenientes inerentes a esse procedimento. Fica claro que amostras clínicas alternativas seriam mais adequadas para utilização em PCR. Matsumoto et al. (1999) compararam os resultados de PCR utilizando como amostras exsudato/raspado, 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 utilização de amostras de sangue seria ainda mais conveniente para estudos em grandes populações. Em leishmaniose visceral a detecção de parasitas no sangue tem sido relatada (Smyth et al., 1992; Singh et al., 1999; Fichoux et al., 1999; Ravel et al., 1995; Lachaud et al., 2000). De fato, Singh et al.

(1999) descreveram bons resultados para a PCR no sangue periférico de doentes com leishmaniose visceral, enquanto que Fichoux et al. (1999) utilizaram esse procedimento para rastrearem amostras em bancos de sangue. Contudo, os relatos de diagnóstico de leishmaniose tegumentar através da detecção de DNA do parasita no sangue periférico são escassos e pertinentes a casos isolados (Guevara & Et, 1993; Guevara et al., 1994; Belli et al., 1998). Mesmo assim, Belli et al. (1998) acham que a detecção de *Leishmania* por PCR no sangue periférico poderia ser útil nas seguintes situações: (i) monitoramento de bancos de sangue; (ii) como fator preditivo de re-ativação de doenças; (iii) avaliação de eficiência terapêutica. Além disso, é importante a viabilização da PCR para utilização mais ampla, haja vista que a confirmação diagnóstica é crítica devido ao alto custo e grande toxicidade dos esquemas terapêuticos aplicáveis na leishmaniose. É também importante identificar as espécies de *Leishmania* envolvidas, porque muitas vezes requerem tratamentos diferenciados e se associam a diferentes prognósticos. A informação epidemiológica derivada da identificação do parasita é relevante para o planejamento adequado das medidas de controle. No presente estudo biópsias cutâneas de doentes foram utilizadas. Entretanto, o método é também adequado para a detecção de *Leishmania* no inseto vetor e em animais silvestres que possam estar participando do ciclo de transmissão da doença, podendo trazer importantes contribuições para um melhor entendimento do padrão e dinâmica de transmissão em diferentes áreas endêmicas.

Tabela 1. Características dos doentes que se enquadraram na definição de caso de LTA.

Características	Casos de LTA	%
Grupo etário		
10 a 29	50	57,5
30 a 49	29	33,3
50 a 59	5	5,7
≥ 60	3	3,5
Sexo		
Masculino	65	74,7
Feminino	22	25,3
Ocupação		
Agricultor	60	69,0
Doméstica	15	17,2
Estudante	7	8,0
Militar	2	2,3
Outras	3	3,5
Total	87	100

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade da PCR específica para o subgênero *Viannia* e da PCR gênero específica.

	PCR específica para o subgênero <i>Viannia</i>	PCR gênero específica
Sensibilidade	94,3 (86,5 – 97,9) %	89,6 (79,1 – 95,3) %
Especificidade	100 (86,3 – 100) %	100 (62,9 – 100) %

O intervalo de confiança calculado ao nível de 95% encontra-se entre parênteses.

Tabela 3. Tabela de contingência mostrando a categorização dos indivíduos estudados aplicando-se a definição de caso de LTA. A. valores para a PCR específica para o subgênero *Viannia*. B. Valores para a PCR gênero específica.

A

TESTE	DOENTES (+)	SADIOS (-)
+	82	11*
-	5	31
TOTAL	87	42

Sensibilidade 94,3% 86,5 – 97,9
Especificidade 73,8% 57,7 – 85,6

B

TESTE	DOENTES (+)	SADIOS (-)
+	60	5*
-	7	11**
TOTAL	67	16

Sensibilidade 89,6% 79,1 - 95,3
Especificidade 68,8% 49,5 - 87,9

* Apesar de não se enquadrar na definição de caso, esses indivíduos apresentam suspeição clínico-epidemiológica.

** Dois desses indivíduos são suspeitos clínico-epidemiologicamente.

Tabela 4. Resultados dos exames complementares dos doentes que se enquadravam na definição de caso de LTA.

Exames complementares	Casos de LTA	%
Pesquisa direta		
Positivo	58	68,2
Negativo	27	31,8
Não realizado	2	----
Histopatologia		
Positivo	71	89,9
Negativo	8	10,1
Não realizado	8	----
Cultura		
Positivo	37	44,0
Negativo	47	56,0
Não realizado	3	----
IFI		
Positivo	65	81,3
Negativo	15	18,7
Não realizado	7	----
Total		
	87	100

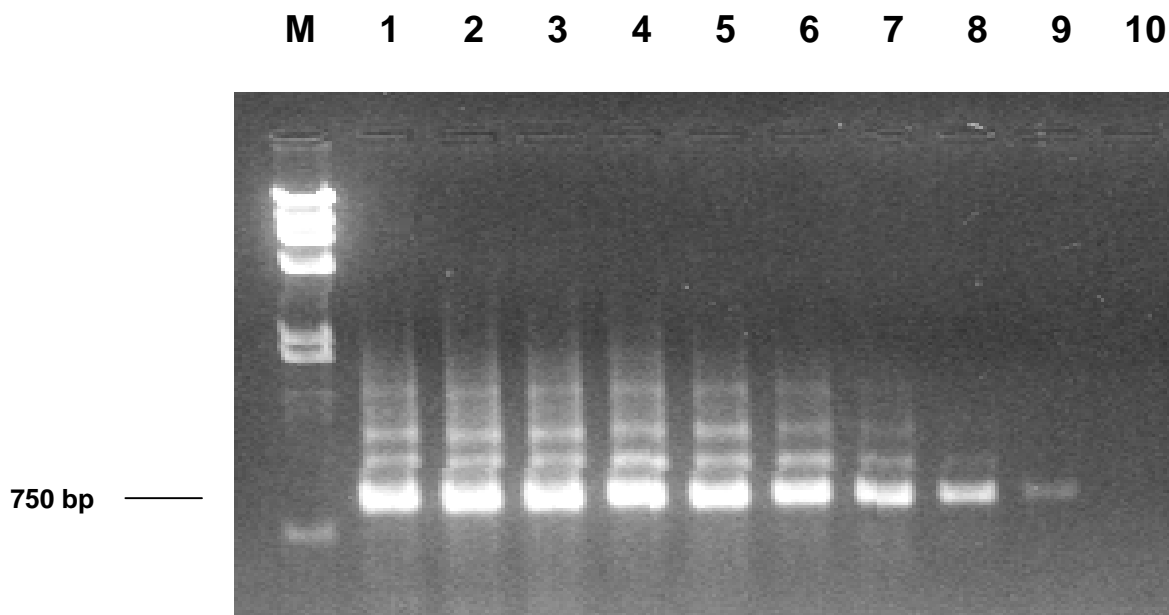


Figura 5. Limiar de detecção usando primers específicos para o subgênero *Viannia*. 1 (30 ng), 2 (14,6 ng), 3 (10 ng), 4 (1 ng), 5 (0,1 ng), 6 (10 pg), 7 (1 pg), 8 (0,1 pg) e 9 (10 fg) e 10 (1fg). O produto de amplificação de 750 pb encontra-se indicado por seta. M, marcador de peso molecular λ +Hind III (23,1, 9,4, 6,6, 4,4, 2,3, 2,0 e 0,56 kb).

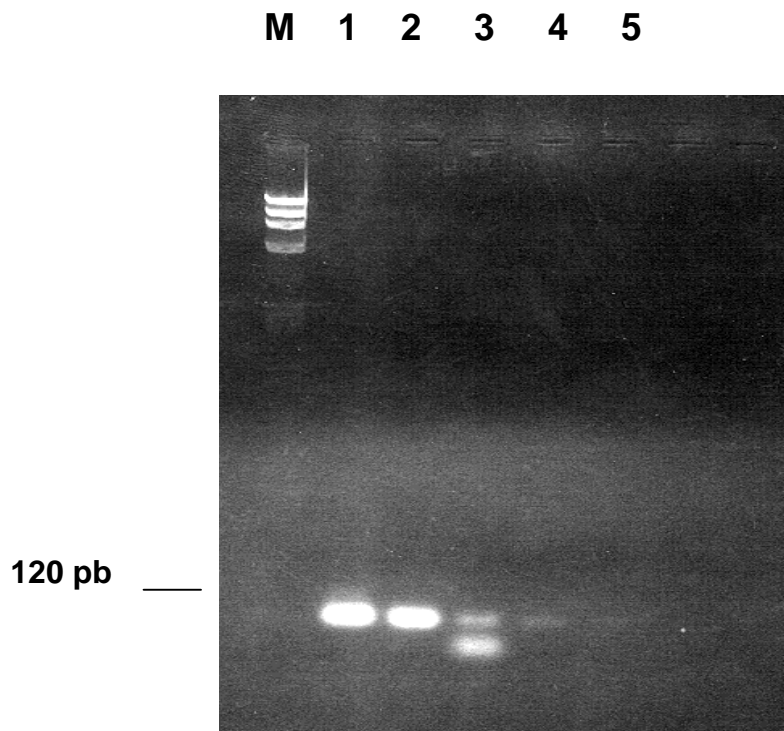


Figura 6. Limiar de detecção usando primers gênero específicos. 1 (1 ng), 2 (0,1 ng), 3 (10 pg), 4 (1 pg), 5 (0,1 pg). O produto de amplificação de 120 pb encontra-se indicado por seta. M, marcador de peso molecular λ + Hind III (23,1, 9,4, 6,6, 4,4, 2,3 kb).

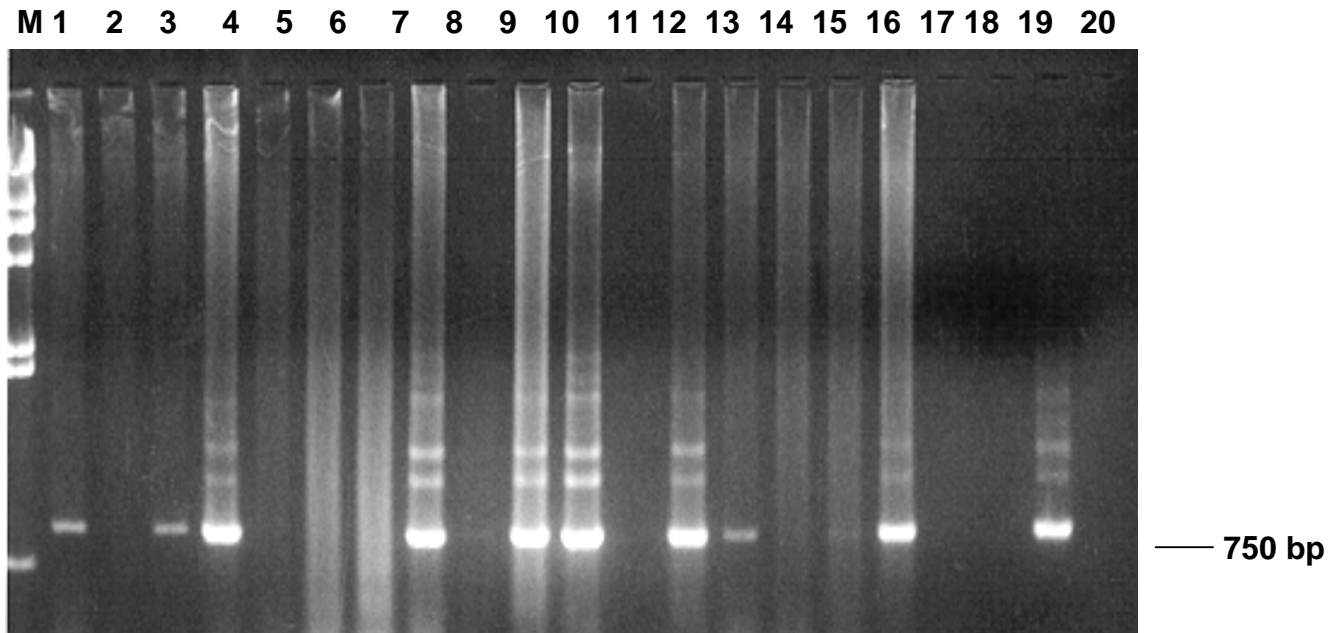


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados a partir de primers específicos para o subgênero *Viannia*. Pacientes com lesões ativas (1-11 - 13,18), lesão cicatrizada (12), controle negativo (19) e controle positivo (20). O produto de amplificação de 750 bp 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).

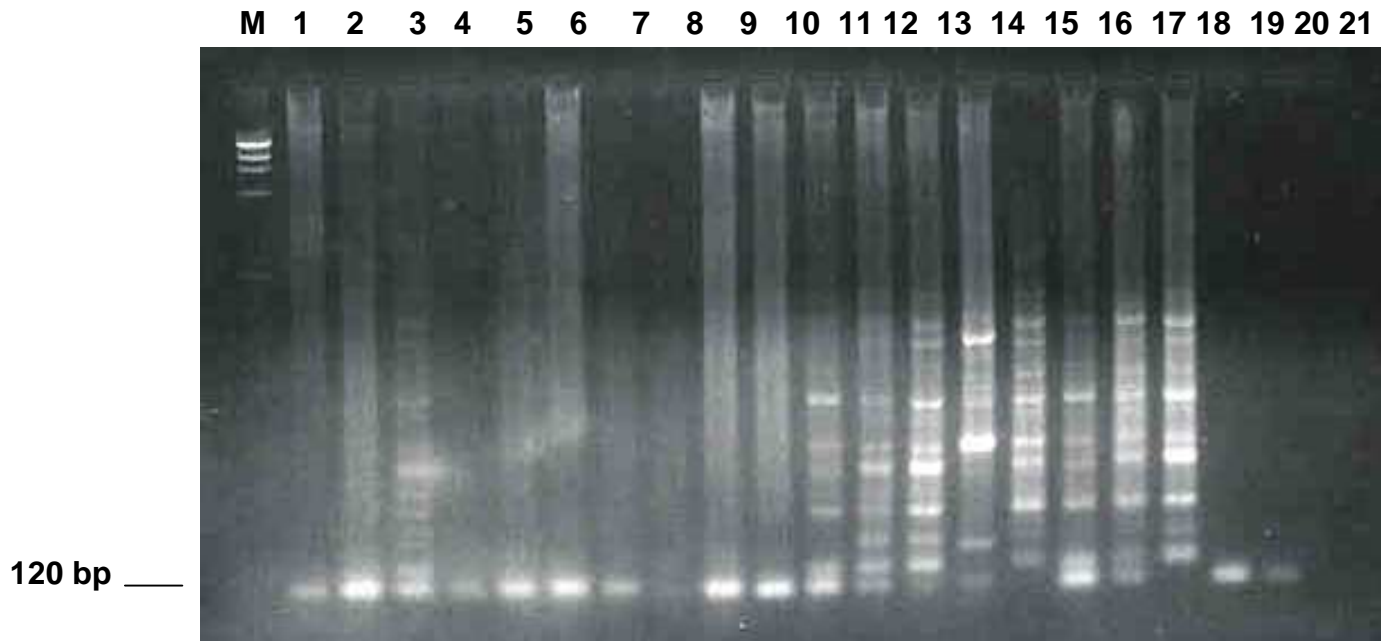


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados a partir de primers específicos para o gênero *Leishmania*. Pacientes com lesões ativas (1-14, 16 - 18), lesão cicatrizada (15), controle positivo (19, 20) e controle negativo (21). O produto de amplificação de 120 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).

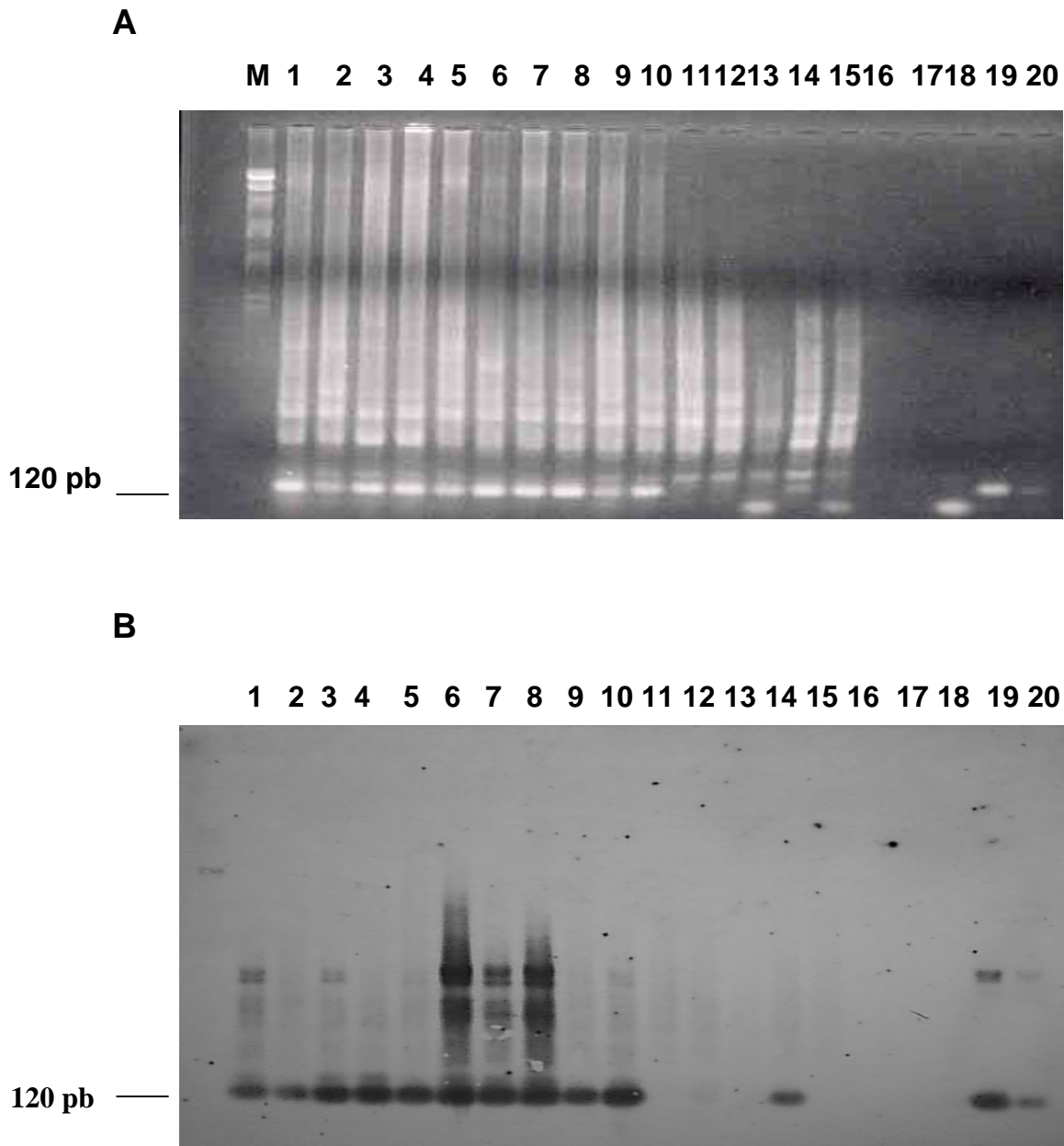


Figura 9 (A) Eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados a partir de primers específicos para o gênero *Leishmania*. Pacientes com lesões ativas (1-10,14), outras doenças (11-13,15), controle negativo (17,18) e controle positivo (19, 20). O produto de amplificação de 120 pb encontra-se indicado por seta. M, λ + Hind III (23,1, 9,4, 6,6, 4,4, 2,3, 2,0 e 0,56 kb). (B) Autoradiografia mostrando os resultados de hibridização com sonda específica para o subgênero *Viannia* dos amplicons resultantes de PCR específica para o gênero *Leishmania*.

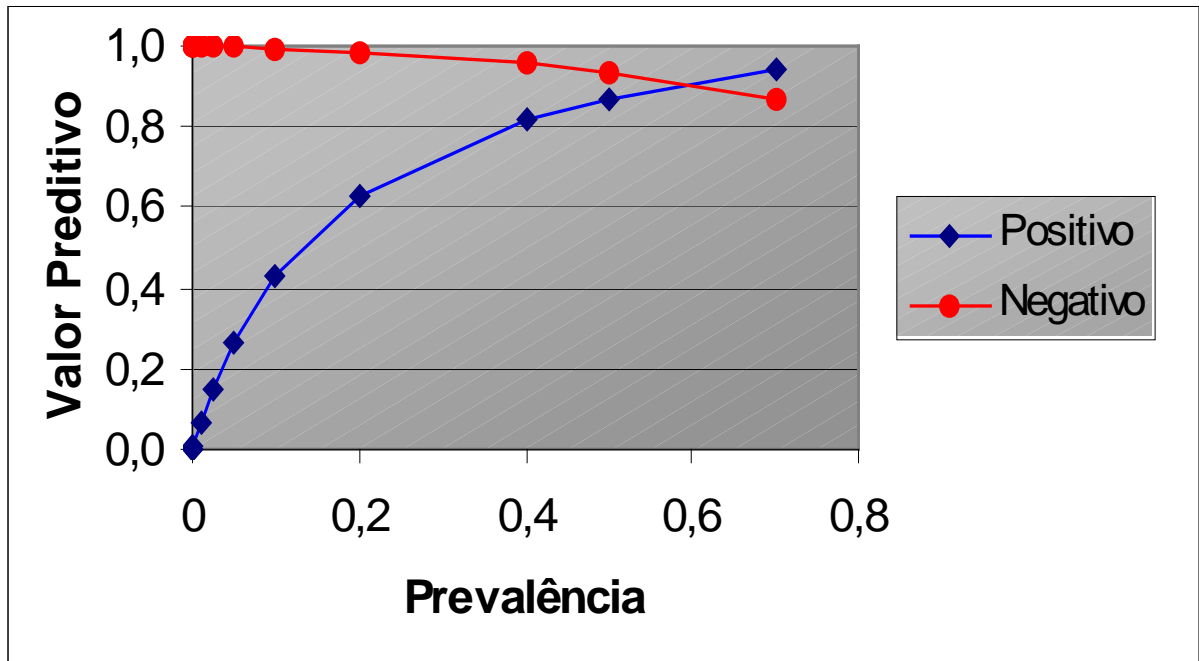


Figura 10. Valores de VPP e VPN da PCR específica para o subgênero *Viannia* para diferentes prevalências hipotéticas.

5. CONCLUSÕES

1. O limiar de detecção de DNA da PCR específica para o subgênero *Viannia* foi de 10 fg de DNA total, podendo teoricamente detectar menos que um parasita. Por outro lado o limiar de detecção para a PCR gênero específica foi de 1 pg de DNA total.
2. A PCR para o subgênero *Viannia* foi positiva em 82/87 doentes resultando em uma sensibilidade de 94,3%. A PCR gênero específica, foi positiva em 60/67 apresentando uma sensibilidade de 89,6%. Contudo, essas diferenças não foram significantes.
3. Ambas as PCRs apresentaram especificidade de 100%.
4. O percentual de positividade dentre os casos de LTA através da pesquisa direta, do exame histopatológico, do isolamento através de cultura e da imunofluorescência indireta foram de 68,2%, 89,9%, 44,0% e 81,3% respectivamente.
5. Com base nos resultados obtidos através da PCR, suas sensibilidades foram significativamente maiores que os percentuais de positividade da pesquisa direta, do isolamento através de cultura e IFI.

6. Experimentos preliminares com PCR-hibridização com sondas moleculares “frias” sugeriram que esse pode ser um formato apropriado para utilização em zonas endêmicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ALMEIDA FILHO, N., ROUQUAYROL, M.Z. Introdução à epidemiologia moderna. 2.ed. Belo Horizonte, Salvador e Rio de Janeiro: COOPMED, 1992. 184p.
- AMBROSENE, C.B., KADLUBAR, F.F. Toward a integrated approaches to molecular epidemiology. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.146, p.912-916, 1997.
- ANTHONY, A.L., CHRISTENSEN, H.A., JOHNSON, C.M. Microenzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of New World leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.29, p.190-194, 1980.
- ARIAS, J., BELTRÁN, F., DESJEUX, P. et al. **Epidemiología y control de la leishmaniasis en las Américas, por país o territorio**. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1996. 52p.
- ARNOT, D.E., BARKER, D.C. Biochemical identification of cutaneous leishmaniasis and analysis of kinetoplast DNA sequence homologies in *Leishmania* cDNA. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.1, p.47-56, 1981.
- ASHALL, F., MILES, A. Diagnosis of parasitic diseases using DNA to DNA hybridization. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.82, p.235-238, 1988.

- AVILES, H., BELLI, A., ARMIJOS, R. et al. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnosis methods. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.85 p.181-187, 1999.
- BAÑULS, A.L., HIDE, M., TIBAYRENC, M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.29, p.1137-1147, 1999.
- BARKER, D.C. Molecular approaches to DNA diagnosis. **Parasitology**, London, v.99, p. 125- 146, 1989.
- 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.
- BARRAL, A., PEDRAL-SAMPAIO, D. Leishmaniasis in Bahia: evidence that *Leishmania amazonensis* reduces a wide spectrum of clinical disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.44, p.536-546, 1991.
- BELLI, A., RODRIGUEZ, B., AVILES, H. 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.
- BENNE, R., VAN DEN BURG, J., BRAKENHOFF, J.P. et al. Major transcript of the frameshifted cox II gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. **Cell**, Cambridge, v.46, p.819,1986.

- BORST, P., HOEIJMAKERS, J.H.J. Kinetoplast DNA - Review. **Plasmid**, New York, n.2, p. 20-40, 1979.
- BRANDÃO-FILHO, S.P., CARVALHO, F.G., BRITO, M.E.F. et al. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: eco-epidemiological aspects in "Zona da Mata" region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 445-449, 1994.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de controle da leishmaniose tegumentar americana**. 2.ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde/Centro Nacional de Epidemiologia, 1993.
- BRITO M.E.F., MENDONÇA M.G., GOMES Y.M. et al. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.7, p.318-321, 2000.
- BRITO, M.E.F. **Desenvolvimento de um método para leishmaniose tegumentar americana com base em western blot de frações antigênicas de *Leishmania braziliensis***. Recife, 1998. 93p. Dissertação (Mestrado em Anatomia Patológica) - Universidade Federal de Pernambuco.
- BRITO, M.E.F., BRANDÃO, S.P., SALES, N.R.S. 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.
- 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**, London, v. 64, p.369-374, 1970.
- CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for the diagnosis of american trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 8, p. 227-234, 1966.
- CAMARGO, M.E., ROBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence test for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.18, p.500-505, 1969.
- CUBA, C.A.C., MARDSEN, P.D., BARRETO, A.C. Parasitologic and immunologic diagnosis of American (mucocutaneous) leishmaniasis. **Bulletin of the Panamerican Health Organization**, Washington, v.15, p.249-259, 1981.
- CUBA, C.A.C., NETTO, E.M., MARSDEN, P.D. et al. Cultivation of *Leishmania braziliensis braziliensis* from skin ulcers in man under field conditions. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.80, p.456-457, 1986.
- CZECHOMICZ, R.T., MILLARD, T.P., SMITH, H.R. et al. Reactivation of cutaneous Leishmania after surgery. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v.141, p.113-116, 2000.
- 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 BRUIJN, M.H.L., LABRADA, L.A., SMYTH, A.J. et al. A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. **Tropical Medicine and Parasitology**, Stuttgart, v.44, p.201-207, 1993.
- DEGRAVE, W., FERNANDES, O., CAMPBELL, D. et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.89, p.463-469, 1994.
- 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.
- EVANS, D. **Handbook on isolation characterization and cryopreservation of *Leishmania***. Geneva: World Health Organization, 1989. 44 p.
- FEINSTEIN, A.R. **Clinical biostatistics**. Saint Louis: The C. V. Mosby Company, 1977. 468 p.
- FICHOUX, Y., QUARANTA, J.F., AUFEUVRE, J.P. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, p.1953 -1957, 1999.
- FNS. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. CENEPI. Série histórica de casos de agravos e doenças e parasitárias: leishmaniose tegumentar. **Informe Epidemiológico do SUS**, Brasília, v. 6, n. 1, p.60, 121-123, v. 6, n. 2, p. 128-130, v. 6, n. 3, p. 134-136, 1997.
- FU, G., PERONA-WRIGHT, G., BARKER, D.C. *Leishmania braziliensis*: characterisation of a complex specific subtelomeric repeat sequence and it use

- in the detection of parasites. **Experimental Parasitology**, New York, v.90, p.236 -243, 1998.
- GRIMALDI JÚNIOR, G., TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v.6, p.230-250, 1993.
- GUEVARA, P., ET, A. *Leishmania braziliensis* in blood 30 years after cure. **The Lancet**, London, v.341, p.1341, 1993.
- GUEVARA, P., ROJAS, E., GONZALEZ, N. et al. Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.1, p. 385-389, 1994.
- HENNEKENS, C.H., BURING, J.E. Epidemiology in medicine. Boston/Toronto: Little, Brown and Company, 1987. p. 383.
- HOMMEL, M., PETERS, W., RANQUE, J., et al. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 72, p. 213-218, 1978.
- IBRAHIM, M.E., SMYTH, A.J., ALI, M.H. et al. The polymerase chain reaction can reveal the occurrence of naturally mixed infections with *Leishmania* parasites. **Acta Tropica**, Basel, v.57, p.327-332, 1994.
- KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v.21, p.123-152, 1995.
- KENNEDY, W.P.K. Novel identification of differences in the kinetoplast DNA of *Leishmania* isolates by recombinant DNA techniques and *in situ* hybridization.

- Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.12, p.313-325, 1984.
- LACHAUD, L., DEREURE, J., CHABBERT, E. et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis with special reference to AIDS patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v.38, p.236-240, 2000.
- LAINSON, R., SHAW, J.J. Leishmaniasis in the New World: taxonomic problems. **British Medical Bulletin**, London, v.28, p.44-48, 1972.
- LASKAY, T., MIKO, T.L., NEGESSE, Y. 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.
- LE BLANCQ, S.M., SCHNUR, L.F., PETERS, W. *Leishmania* in the Old World: the geographical and hostal distribution of *L. major* zymodemes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.80, p.99-112, 1986.
- MARZOCHI, M.C.A. Curso - Doenças Infecto-Parasitárias. Leishmaniose no Brasil: as leishmanioses tegumentares. Jornal Brasileiro de Medicina, Rio de Janeiro, v.63, n.5/6, p.82-104, 1992.
- MARZOCHI, M.C.A., COUTINHO, S.G., SABROZA, P. C. et al. Reação de imunofluorescência indireta e intradermorreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.22, p.149-155, 1980.

- MARZOCHI, M.C.A., MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil - emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.2, p.359-375, 1994.
- MASSAMBE, N.N., MUTINGA, M.J. Recombinant DNA (kDNA) probe for identifying *Leishmania tropica*. **Acta Tropica**, Basel, v.52, p.1-15, 1992.
- MATOSSIAN, R.M., KURBAN, A.K., MALAK, J.A. Circulating antibodies in cutaneous leishmaniasis, their detection by immunofluorescence. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.69, p.450, 1975.
- MATSUMOTO, T., HASHIGUCHI, Y., GOMEZ, E. A. 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.
- McADAM, A.J. Guest commentary. Discrepant analysis: how can we test a test ? **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, p. 2027-2029, 2000.
- McCANN, S.H.E., ERESH, S., BARKER, D.C. Kinetoplast minicircle DNA from *Leishmania (Viannia) lainsoni*. **Parasitology**, London, v.118, p.371-374, 1999.
- McMAHON PRATT, D., BENNET, E., DAVID, J.R. Monoclonal antibodies that distinguish sub-species of *Leishmania braziliensis*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.129, p.926-929, 1981.
- MENDONÇA, M.G. **Persistência de *Leishmania* em lesões clinicamente curadas de leishmaniose tegumentar americana**. Recife, 1999. 75p. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Pernambuco.

- 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.
- MENZEL, S., BIENZLE, V. Antibody responses in patients with cutaneous leishmaniasis of the world. **Tropenmedizin und Parasitologic**, Stuttgart, v.29, p.194, 1978.
- MOMENI, A.Z., YOTSUMOTO, S., MEHREGAN, D.R. et al. Chronic lupoid leishmaniasis. Evaluation by polymerase chain reaction. **Archives of Dermatology**, Chicago, v.132, p.198-202, 1996.
- MORGAN, U.M., THOMPSON, R.C.A. Molecular detection of parasitic protozoa. **Parasitology**, London, v.117, p.73-85, 1998.
- NAVIN, T.R., ARANA, F.A., DE MÉRIDA, A.M. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of the diagnostic. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 42, p. 36-42, 1990.
- PACHECO, R.S., GRIMALDI, G., MOMEN, H. et al. Population heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. **Parasitology**, London, v.100, p.393-398, 1990.
- PASSOS, V.M.A., FERNANDES, O., LACERDA, P.A.F. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the state of Minas Gerais, Southeast Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v.72, p.251-258, 1999.

- PERSING, D.H., SMITH, T.F., TENOVER, F.C., et al. **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p. 641.
- PIRMEZ, C., SILVA TRAJANO, V., OLIVEIRA NETO, M.P. et al. Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, p.1819-1823, 1999.
- POGUE, G.P., KOUL, S., LEE, N.S. et al. Identification of intra and interspecific *Leishmania* genetic polymorphisms by arbitrary primed polymerase chain reactions and use of polymorphic DNA to identify differentially regulated genes. **Parasitology Research**, Berlin, v.81, p.282-290, 1995.
- RAVEL, S., CUNY, G., REYNES, J. 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.
- RODGERS, M.R., POPPER, S.J., WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, New York, v.71, p.267-275, 1990.
- RODRIGUEZ, N., GUZMAN, B., RODAS, A. et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, p.2246-2252, 1994.
- RODRIGUEZ, N., RODRIGUEZ, A., CARDONA, M.A. et al. *Leishmania (Viannia) guyanensis*: a new minicircle class exclusive to this specie isolated from a DNA cosmid library useful for taxonomic purposes. **Experimental Parasitology**, New York, v.94, p.143-149, 2000.

- ROGERS, W.O, WIRTH, D.F. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.84, p.565-569, 1987.
- ROUQUAYROL, M.Z., ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia & Saúde**. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. 600p.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SCHATZ, G., MASON, T.L. The biosynthesis of mitochondrial proteins. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, n.43, p.51-87, 1974.
- SCHUBACH A., MARZOCHI M. C., CUZZI-MAYA T. et al. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.58, p.824-827, 1998.
- SCHULTE, P.H., PERERA, F.P. **Molecular epidemiology**: principles and practice. London: Academic Press, 1993. 244p.
- SHAW, J. J., LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil X. Some observations on intradermal reaction to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.69, p.323, 1975.
- SHPIBERG, O., ET, A. The next stage molecular epidemiology. **Journal Clinical Epidemiology**, Oxford, v.50, p.633-636, 1998.

- SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.27, p.1135-1145, 1997.
- SINGH, N., CURRAN, M.D., RASTOGIL, A.K. et al. Diagnostic PCR with *Leishmania donovani* specificity using sequences from variable region of kinetoplast minicircle DNA. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.4, p.448-453, 1999.
- SMYTH, A.J., GHOSH, A., HASSAN, M.Q., 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.
- STURM, N.R; SIMPSON, L. Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. **Cell**, Cambridge, n.61, p.879, 1990.
- THOMPSON, R.C.A., CONSTANTINE, C.C., MORGAN, U.M. Overview and significance of molecular methods what role for molecular epidemiology. **Parasitology**, London, v.117, p.161-175, 1998.
- TOPLEY & WILSON'S. **Microbiology and microbial infections**. 19.ed. New York: Oxford University Press, 1998.
- WALTON, B.C., SHAW, J.J., LAINSON, R. Observation on the *in vitro* of *Leishmania braziliensis*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.63, p.1118-1119, 1977.
- WEIGLE, K.A., DE DÁVALOS, M., HEREDIA, P. 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.
- WEISS, J.B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.8, p.113-130, 1995.
- WHO. World Health Organization. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Disponível em : <<http://www.who.int/tdr/index.html>>. Acesso em junho de 2000.
- WILSON, S.M. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: field applications and practicalities. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v.89, p.95-100, 1995.
- WINCKER, P., RAVEL, C., BLAINEAU C. et al. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, p.1688-1694, 1996.
- WIRTH, D.F., McMAHON PRATT, D. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. **Proceedings of the National Academy of Science of United States America**, Washington, v.79, p.6999-7003, 1982.

7. ANEXOS

V Jornada Científica de Pós-Graduação da Fiocruz/1999

VALIDAÇÃO DE ABORDAGENS MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Eduardo Henrique Gomes Rodrigues

Curso de Mestrado em Saúde Pública/NESC

Unidade: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

E-mail: eduardoh@cpqam.fiocruz.br / eduardoh@mlink.com.br

Telefone: (081)271.4000

Orientador: Frederico Guilherme Coutinho Abath

Coorientador: Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

As leishmanioses são enfermidades causadas por várias espécies de gênero *Leishmania*. Estima-se que há 12 milhões de casos no mundo e que aproximadamente 350 milhões de pessoas estão sob risco de infecção. No Nordeste do Brasil a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é considerada um importante problema de saúde pública, sendo predominantemente causada por *L. b. braziliensis*. Utilizamos a abordagem de PCR com oligonucleotídeos que amplificam uma região do kDNA específica para o complexo *Leishmania braziliensis*, com o objetivo de avaliar o desempenho desse sistema no diagnóstico de leishmaniose tegumentar em pacientes provenientes de áreas endêmicas de Pernambuco. As amostras consistiam em DNA purificado de biópsias cutâneas. Inicialmente foi determinado o limiar de detecção para as nossas condições de PCR, sendo possível a detecção de pelo menos 1 fg de DNA total de promastigotas de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M-2903). A reação foi realizada em um volume final de 25 µl contendo Tris HCl 10 mM, KCl 50 mM, gelatina 0,1 mg/ml, MgCl₂ 1,5 mM, 200 mM de dNTP, 25 pmoles dos primers e 2,5 U de Taq Polymerase. Foram utilizados 2 µl de cada amostra contendo DNA, e dos controles positivos e negativos apropriados. A amplificação consistiu de 35 ciclos de 1 minuto cada a 94°C, 65°C e 72°C, precedido de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C. Doze µl dos produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Foram estudadas biópsias cutâneas de 59 indivíduos (53 com lesões ativas, 4 com lesões cicatrizadas e 2 com lesões cutâneas de outras etiologias). A amplificação específica da banda diagnóstica de 750 pb foi observada em 48 pacientes com lesões ativas (90,5%), em 1 indivíduo com lesão cicatrizada, não havendo detecção do alvo em portadores de outras doenças cutâneas. No momento estamos ampliando o tamanho das amostras a serem processadas e analisando alguns padrões de amplificação atípicos.

Apoio Financeiro: FACEPE

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 94 (supp. II): p.156, 1999.

MB3-58 – VALIDATION OF THE USE OF POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DIAGNOSING AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN PERNAMBUCO STATE, BRAZIL

Rodrigues, E.H.G.¹; Brito, M.E.F.¹; Mendonça, M.G.³; Brandão-Filho, S.P.¹; Jardim, M.L.³; Albuquerque, M.F.P.M.²; Fernandes, O.⁴ & Abath, F.G.C.¹

¹Departamento de Imunologia e ²Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife-PE. ³Departamento de Dermatologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE. ⁴Departamento de Medicina Tropical, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ

The leishmaniasis are caused by several species of the genus *Leishmania*. It is estimated that there are 12 million people infected in the world and approximately 350 million under risk of infection. In Northeast Brazil, American tegumental leishmaniasis is an important public health problem, and is predominantly caused by *Leishmania Viannia braziliensis*.

Two PCR based approaches targetting kDNA regions were used with the aim of evaluating the performance of the systems in the diagnosis of leishmaniasis patients from endemic areas of Pernambuco State, Brazil. One PCR system was specific for the subgenus *Viannia* (De Bruijn *et al.*, 1993, *Trop. Med. Parasitol.* 44:201-207) and the other genus specific, requiring additional hybridization for the identification of groups of *Leishmania* (Schubach *et al.*, 1998, *J. Infect. Dis.* 178:911-914). The detection limit was 10 fg and 1 pg of *L. V. braziliensis* (MHOM/BR/75/M-2903) genomic DNA, respectively for the first and second approaches. Ten µl of the amplification products were analysed by agarosis electrophoresis.

With regard to patients with active lesions 53/59 (90%) were positive using the subgenus *Viannia* specific PCR whereas 47/59 (79.6%) were positive using the genus specific PCR. One out of 4 patients with healed lesions were positive by the *Viannia* specific PCR. No amplification occurred in patients with cutaneous lesions caused by other organisms. We are currently comparing the results with other obtained through conventional diagnostic methods and evaluating if some atypical profiles obtained can be ascribed to intraspecific variation, since these endemic areas have not been extensively studied before.

Financial Support: FACEPE

VI Jornada Científica de Pós-Graduação da Fiocruz/2000

Persistência de *Leishmania* em lesões clinicamente curadas de leishmaniose tegumentar americana

Autor: Eduardo Henrique Gomes Rodrigues

Orientador: Frederico Guilherme Coutinho Abath

Coorientador: Maria de Fátima Pessoa Militão Albuquerque

Unidade: CPqAM

Departamento/Laboratório: Imunologia
Bioquímica e Biologia Molecular

A *Leishmaniose tegumentar americana* (LTA) é endêmica em várias regiões do estado de Pernambuco, constituindo-se em importante problema de saúde pública, sendo predominantemente causada por *L. b. braziliensis*. Dessa forma, avaliamos através de PCR a presença de DNA do parasita em lesões cicatrizadas. Utilizamos a abordagem de PCR com oligonucleotídeos que amplificam uma região do kDNA de 750 pb, específica para o complexo *Leishmania braziliensis*. A reação foi realizada em um volume final de 25 µl contendo Tris HCl 10 mM, KCl 50 mM, gelatina 0,1 mg/ml, MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de dNTP, 25 pmoles de primers apropriados e 2,5 U de Taq Polymerase. Foram utilizados 2 µl de cada amostra contendo DNA, e dos controles positivos e negativos apropriados. A amplificação consistiu de 35 ciclos de 1 minuto cada a 94°C, 65°C e 72°C precedidos de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C. Dez µl dos produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Foram estudadas as biópsias cutâneas de cicatrizes em 31 indivíduos. A amplificação específica da banda diagnóstica de 750 pb foi observada em 29 pacientes (93,5%). Não houve detecção do alvo em portadores de outras doenças cutâneas. A possibilidade de leishmânias persistirem em cicatrizes de pacientes curados clinicamente tem reflexos importantes na epidemiologia, imunologia e tratamento da doença, bem como requer um acompanhamento e orientação desses pacientes, após a cura clínica.

E-mail: eduardoh@cpqam.fiocruz.br / eduardoh@nlink.com.br

Suporte Financeiro: FACEPE