

Universidade de São Paulo

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo



Marcela Miura Satow

**Padronização e validação de marcadores moleculares para
o diagnóstico da leishmaniose tegumentar**

**Tese apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo para
obtenção de título de Doutor em
Ciências.**

**Área de Concentração: Doenças
Tropicais e Saúde Internacional.**

Orientador: Prof. Dr. Paulo C. Cotrim

São Paulo

2016

MARCELA MIURA SATOW

Padronização e validação de marcadores moleculares para o diagnóstico da
leishmaniose tegumentar.

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de
São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção
de título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Doenças Tropicais e
Saúde Internacional.

Orientador: Prof. Dr. Paulo C. Cotrim

São Paulo

2016

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Satow, Marcela Miura

Padronização e validação de marcadores moleculares para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar / Marcela Miura Satow. – São Paulo, 2016.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientador: Paulo César Cotrim

Descritores: 1. LEISHMANIOSE CUTÂNEA. 2. REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE. 3. LEISHMANIA. 4. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO E PROCEDIMENTOS.

USP/IMTSP/BIB-03/2016.

A todos que acreditaram que
este dia enfim chegaria e não
me deixaram esmorecer no
caminho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo C. Cotrim, pela oportunidade de realizar este trabalho e permitir minha participação em sua equipe.

À Profa. Dra. Thelma Suely Okay e Dra. Kelly Aparecida Kanunfre pela amizade, apoio, dedicação, pela disponibilidade em sempre ajudar e ensinar.

Ao Dr. José Angelo Lauletta Lindoso por colaborar com a coleta de material biológico e permitir a utilização deste neste trabalho e pela contribuição científica.

Aos médicos infectologistas: Luiza Keiko Oyafuso, Rita de Cássia Soler que auxiliaram na obtenção de material, informações epidemiológicas dos pacientes para realizar este trabalho.

À Dra. Elisa Cupollilo e a equipe da FIOCRUZ, RJ pela oportunidade de participar do treinamento em diagnóstico molecular para leishmanioses, essencial para execução deste projeto.

A FAPESP por financiar este projeto (Processo nº 2010/16963-4).

A CAPES por conceder bolsa de doutorado nos primeiros anos de projeto.

À Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro – Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo por ceder DNA de fungos para a realização de testes de especificidade deste estudo.

À Profa. Dra. Marta Teixeira e Prof. Dr. Jeffrey Shaw pelas cepas e DNA genômico de *Leishmania* e tripanossomatídeos cedidos.

À Profa. Dra. Eufrosina Setsu Umezawa por ceder cepas de tripanossomatídeos para a realização de testes de especificidade deste estudo.

À secretária da seção de pós-graduação, Eliane Araújo, que acreditou e me ajudou a prosseguir o doutorado.

Ao bibliotecário Carlos José Quinteiro pela revisão das citações e referências bibliográficas desta tese.

À Edite H. Y. Kanashiro, minha mãe-científica, obrigada por sua amizade, apoio, ensinamentos científicos e de vida e determinação.

À Mussya Cisotto Rocha por sua amizade e alegria contagiante.

Aos amigos de laboratório pela amizade e experiências compartilhadas: Jú, Luiza, Chris, Marina, Eduardo, Lilian, Regina, Bia, Jonathan, Thaynan, Luciana, Mariane, Hiro, Adriano, Camila, Aline, Júlio, Lydia, Carmen, Dr. Walter, Eunice, Nilzete, Egon, Lúcia Braz, Bete, Sandra.

Ao meu terapeuta, Dr. Roberto Cheda Eid, fundamental para manter minha sanidade mental nesta etapa da minha vida.

Aos meus amigos e parentes queridos pelo apoio e sabedoria compartilhada.

Aos meus filhotes, Théo e Shiga, que mesmo sem compreender direito, contribuíram muito com sua companhia, por me ensinarem que a felicidade está nos pequenos momentos mágicos do dia, e por me fazerem levantar todos os dias da cama e ir à luta.

Aos amigos e colegas da SUVIS M'Boi Mirim: Marly, Isabela, Rosely, Adriana, Adrienne, Luciana, Gustavo, Dayse, Leandro Alexandre, Leandro Pereira, Ivanildo C., Alcides, Nelson, Rita, Benedita, Aline, Felipe, Marcos José, Adriana Lucas, Gilda, Idel pela compreensão, amizade e apoio.

Ao meu companheiro Alfeu, pelo apoio, paciência, carinho e por estar sempre disposto em me ajudar.

Enfim, aos meus pais e minha irmã Paty, que sempre me apoiaram em minhas escolhas.

RESUMO

Satow MM. Padronização e validação de marcadores moleculares para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

O diagnóstico da leishmaniose tegumentar (LT) baseia-se em critérios clínicos e epidemiológicos podendo ser confirmado por exames laboratoriais de rotina como a pesquisa direta do parasito por microscopia e a intradermoreação de Montenegro. Atualmente, os métodos moleculares, principalmente a reação da cadeia da polimerase (PCR), têm sido considerados para aplicação em amostras clínicas, devido a sua alta sensibilidade e especificidade. Este trabalho teve como objetivo a padronização e validação das técnicas de PCR-RFLP com diferentes iniciadores (*kDNA*, *its1*, *hsp70* e *prp1*), visando o diagnóstico e a identificação das espécies de *Leishmania* presentes em amostras de DNA provenientes de lesões de pele ou mucosa de 140 pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar. Para tal, realizamos ensaios de: 1) sensibilidade das PCRs com os diferentes iniciadores, 2) especificidade dos ensaios utilizando DNAs de diferentes espécies de referência de *Leishmania*, de tripanossomatídeos inferiores e de fungos, 3) validação das técnicas de PCR-RFLP com os iniciadores estudados em amostras de DNA de lesões de pele ou mucosas de pacientes com LT. Os resultados dos ensaios de limiar de detecção das PCR (sensibilidade) mostraram que os quatro iniciadores do estudo foram capazes de detectar o DNA do parasito, porém em quantidades distintas: até 500 fg com os iniciadores para *kDNA* e *its1*, até 400 fg com *hsp70* e até 5 ng com *prp1*. Quanto à especificidade dos iniciadores, não houve amplificação dos DNAs fúngicos. Por outro lado, nos ensaios com os iniciadores para *kDNA* e *hsp70*, verificamos amplificação do fragmento esperado em amostras de DNA de tripanossomatídeos. Nos ensaios com *its1* e *prp1*, o padrão de amplificação com os DNAs de tripanossomatídeos foi diferente do apresentado pelas espécies de *Leishmania*. Verificou-se nos ensaios de validação que o PCR-*kDNA* detectou o parasito em todas as 140 amostras de DNA de pacientes e, assim, foi utilizado como critério de inclusão das amostras. A PCR-*its1* apresentou menor sensibilidade, mesmo após a reamplificação com o mesmo iniciador (85,7% ou 120/140 amostras). Para os ensaios da PCR-*hsp70*, as amostras de DNA foram amplificadas com Repli G, para obter uma sensibilidade de 68,4% (89/140 amostras). A PCR-*prp1* não detectou o parasito em amostras de DNA dos pacientes. Quanto aos ensaios para a identificação da espécie presente na lesão, a PCR-*kDNA*-RFLP-*HaeIII* e a PCR-*its1*-RFLP-*HaeIII* permitem a distinção de *L. (L.) amazonensis* das outras espécies pertencentes ao subgênero *Viannia*. A PCR-*hsp70*-RFLP-*HaeIII*-*BstUI*, apesar de potencialmente ser capaz de identificar as seis espécies de *Leishmania* analisadas, quando utilizada na avaliação das amostras humanas permitiu apenas a identificação de *L. (V.) braziliensis*. No entanto, é uma técnica com várias etapas e de difícil execução, o que pode inviabilizar o seu uso rotineiro em centros de referência em diagnósticos. Assim, recomendamos o uso dessa metodologia apenas em locais onde várias espécies de *Leishmania* sejam endêmicas. Finalmente, os resultados indicam que o *kDNA*-PCR devido à alta sensibilidade apresentada e facilidade de execução pode ser empregada como exame de rotina nos centros de referência, permitindo a confirmação ou exclusão da LT.

Descritores: Leishmaniose cutânea. Reação em cadeia por polimerase. Técnicas e procedimentos de laboratório. *Leishmania*

ABSTRACT

Satow MM. Standardization and validation of molecular markers for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis (thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016

The diagnosis of cutaneous leishmaniasis is based on clinical and epidemiological criteria and can be confirmed by routine laboratory tests such as direct detection of parasites by microscopy and by Montenegro skin test. Currently, the molecular methods, especially the polymerase chain reaction (PCR) have been considered for use in clinical samples due to its high sensitivity and specificity. This study aimed to standardize and validate the PCR-RFLP techniques with different primers (*kDNA*, *its1*, *hsp70* and *prp1*) for the diagnosis and identification of *Leishmania* species present in DNA samples from skin or mucosal lesions of 140 patients with suspected cutaneous leishmaniasis. The following assays were performed to evaluate the 1) sensitivity of the PCRs with different pairs of primers, 2) specificity of the markers using DNAs of various species of *Leishmania*, lower trypanosomatids and fungi, 3) validate the PCR-RFLP techniques with DNA samples from skin or mucosal lesions of patients with LT. The results of the PCR detection threshold tests (sensitivity) showed that the four study pairs of primers were able to detect the DNA of the parasite, but in different quantities: up to 500 fg with *kDNA* and *its1*, 400 fg with *hsp70* and up to 5 ng with *prp1*. Regarding the specificity of the primers, no amplification was observed with fungal DNA. On the other hand, the expected fragments for *kDNA* and *hsp70* PCR were amplified with DNA of trypanosomatids. In *its1* and *prp1*-PCR the pattern of amplification with the DNA of trypanosomatids was different of the one observed for species of *Leishmania*. In validation assays of PCR-*kDNA* protocol the parasite was detected in all 140 DNA samples from patients and it was used as inclusion criteria of the samples. The *its1*-PCR showed lower sensitivity even after reamplification (85.7% or 120/140 samples). The *hsp70*-PCR validation test was done with DNA samples amplified with Repli G, we obtained a sensitivity of 68.4% (89/140 samples). The PCR-*prp1* did not detect the parasite in DNA samples from patients. Concern the tests for the identification of species present in the lesion, PCR-RFLP *kDNA-HaeIII* and PCR-RFLP *ITS1-HaeIII* enable distinction *L. (L.) amazonensis* from the other species belonging to the subgenus *Viannia*. The PCR-RFLP *hsp70-BstUI, HaeIII*, although potentially able to identify the six species of *Leishmania* studied, when it was used in the evaluation of only human samples, it identified only *L. (V.) braziliensis*. However, PCR-RFLP *hsp70-BstUI, HaeIII* is a technique with several stages and difficult to implement, which can derail your routine use in referral centers for diagnosis. Thus, we recommend using this method only in places where various *Leishmania* species are endemic. Finally, our results indicate that *kDNA*-PCR due to the high sensitivity and ease of execution could be used as a routine examination in reference centers, allowing the confirmation or exclusion of LT.

Descriptors: Cutaneous leishmaniasis. Polymerase chain reaction. Technical and procedures for laboratory. *Leishmania*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Distribuição geográfica dos pacientes com LT do grupo de estudo.55
- Figura 2- Limiar de detecção (sensibilidade analítica) da PCR *kDNA*. Eletroforese em gel de agarose mostrando os produtos de amplificação do *kDNA* com DNA de *L. (V.) braziliensis*. Concentrações de DNA: 200 ng a 5 ag. Experimentos (A) sem e (B) com a adição de 50 ng de DNA humano. (PM): Marcador de peso molecular, (N): Controle Negativo.....57
- Figura 3- Limiar de detecção (sensibilidade analítica) da PCR-*its1*. Eletroforese em gel de agarose com produtos de amplificação da PCR-*its1* com DNA de *L. (V.) braziliensis*. Concentrações de DNA: 200 ng a 50 fg. Experimentos (A) sem e (B) com a adição de 50 ng de DNA humano. (PM): Marcador de peso molecular, (N): Controle Negativo.57
- Figura 4- Limiar de detecção (sensibilidade analítica) por PCR utilizando iniciadores para *hsp70*. Eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos de amplificação do DNA de cepas de *L. (L.) amazonensis* (La1, La 2) e *L. (V.) braziliensis* (Lb1), nas concentrações de DNA indicadas. N- controle negativo. (PM) Marcadores de peso molecular: A- Ultra low range ladder (Fermentas®); B- 100 bp Gene Ruler (Fermentas®).58
- Figura 5- Limiar de detecção (sensibilidade analítica) da PCR utilizando iniciadores para *prp1*. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR-*prp1* de DNA de *L. (V.) braziliensis* em diferentes concentrações: 200 ng a 50 pg; (A) sem DNA humano e (B) com 50 ng de DNA humano. (PM) Marcador de peso molecular.59
- Figura 6- Ensaio de especificidade com dos iniciadores *kDNA* (A); *its1* (B); *hsp70* (C); *prp1* (D). Eletroforese em gel de agarose. Marcador de Peso molecular (PM). N- Controle negativo, Ln- *L. (V.) naiffi*; Ll- *L. (V.) lainsoni*; Ls- *L. (V.) shawi*; Lg- *L. (V.) guyanensis*; Lb- *L. (V.) braziliensis*; La- *L. (L.) amazonensis* Li: *Leishmania (L.) infantum chagasi*; Lt: *Leishmania tarentolae*; Tc- *Trypanosoma cruzi*; Ca- *Crithidia acanthocephali*; Cf: *Crithidia faciculata*; Cl - *Crithidia lucilae*; B- *Blastocrithidia sp.*; Es- *Endotrypanum schaudinni*; L- *Leptomonas sp.*; Hc- *Histoplasma capsulatum*; Fp- *Fonsecaea pedrosoi*; Pb- *Paracoccidioides brasiliensis*. 62
- Figura 7- Produtos de PCR-*kDNA*-RFLP-*HaeIII*. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. (PM) Marcador de peso molecular, N- Controle negativo, Ln- *L. (V.) naiffi*; Ll- *L. (V.) lainsoni*; Ls- *L. (V.) shawi*; Lg- *L. (V.) guyanensis*; Lb- *L. (V.) braziliensis*; La- *L. (L.) amazonensis*. Tabela auxiliar com os pesos moleculares gerados após RFLP baseada no trabalho de Volpini et al.²⁵.65
- Figura 8- Produtos de PCR-*its1*-RFLP-*HaeIII*. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. PM- Marcador de peso molecular, N- Controle negativo, Ln- *L. (V.) naiffi*; Ll- *L. (V.) lainsoni*; Ls- *L. (V.) shawi*; Lg- *L. (V.) guyanensis*; Lb- *L. (V.) braziliensis*; La- *L. (L.) amazonensis*. Tabela auxiliar com os produtos de RFLP baseada em Schonian et al.³⁰66

- Figura 9- Produtos de digestão enzimática com *HaeIII* (A) e com *BstUI* (B) dos produtos do PCR-*hsp70*. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. PM- Marcador de peso molecular, N- Controle negativo, Ln- *L. (V.) naiffi*; Ll- *L. (V.) lainsoni*; Ls- *L. (V.) shawi*; Lg- *L. (V.) guyanensis*; Lb- *L. (V.) braziliensis*; La- *L. (L.) amazonensis*. Padrões eletroforéticos obtidos: a- d: RFLP-*HaeIII* e 1-5: RFLP-*BstUI*.67
- Figura 10- Produtos de amplificação da PCR-*prp1* de espécies de leishmânias associadas a LT no Brasil. Eletroforese em gel de agarose a 2%. PM- Marcador de peso molecular. N- Controle negativo, Ln- *L. (V.) naiffi*; Ll- *L. (V.) lainsoni*; Ls- *L. (V.) shawi*; Lg- *L. (V.) guyanensis*; Lb- *L. (V.) braziliensis*; La- *L. (L.) amazonensis*; Li- *L. (L.) infantum chagasi*.68
- Figura 11- Produtos de PCR- *kDNA*-RFLP-*HaeIII* com DNA de lesões cutâneas ou mucosas. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. PM- Marcador de peso molecular. Lb- *L. (V.) braziliensis* (controle); 1-7: Amostras de DNA de pacientes com LT.....69
- Figura 12- Produtos de PCR-*its1*-RFLP-*HaeIII* com DNA de lesões cutâneas ou mucosas. Eletroforese em gel de poliacrilamida. PM- Marcador de peso molecular, N- controle negativo, Lb- *L. (V.) braziliensis* (controle); 1-9: Amostras de DNA de pacientes com LT.....70
- Figura 13- Produtos de PCR-*hsp70*-RFLP-*HaeIII*- *BstUI* com DNA de lesões cutâneas ou mucosas. Eletroforese em gel de poliacrilamida. PM: Marcador de peso molecular, A- Produtos de PCR-*hsp70*-RFLP-*HaeIII*. B- Produtos de PCR-*hsp70*-RFLP-*BstUI*. La- *L. (L.) amazonensis*, Lb- *L. (V.) braziliensis*; Li- *L. (L.) infantum chagasi*. 1-5: Amostras de DNA de lesões.70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características epidemiológicas das leishmânias associadas a leishmaniose tegumentar humana no Brasil.	21
Tabela 2- Características clínicas, parasitológicas, de resposta celular e humoral nas diferentes formas clínicas de leishmaniose tegumentar no Brasil.	33
Tabela 3- Microrganismos utilizados neste estudo.....	39
Tabela 4- Oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação (PCR) neste estudo.....	46
Tabela 5- Protocolos de PCR para detecção e identificação das espécies de leishmânias utilizadas neste estudo.....	52
Tabela 6- Resultados dos ensaios de detecção de DNA de <i>L. (V) braziliensis</i> por PCR com diferentes iniciadores em reação com volume total de 50 µL.	60
Tabela 7- Desempenho dos testes moleculares para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar.	63
Tabela 8- Comparação entre os resultados do PCR- <i>its1</i> reamplificação e <i>hsp70</i> em 130 indivíduos com leishmaniose tegumentar.....	64
Tabela 9- Combinação dos padrões eletroforéticos obtidos por PCR- <i>hsp70</i> -RFLP- <i>HaeIII</i> e <i>BstUI</i> para identificação das espécies de leishmânias. Ln- <i>L. (V.) naiffi</i> ; Ll- <i>L. (V.) lainsoni</i> ; Ls- <i>L. (V.) shawi</i> ; Lg- <i>L. (V.) guyanensis</i> ; Lb- <i>L. (V.) braziliensis</i> ; La- <i>L. (L.) amazonensis</i> . Padrões eletroforéticos obtidos após digestão com: <i>HaeIII</i> : a-d e <i>BstUI</i> : 1-5.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD	Demanda biológica de oxigênio
CLIOC	Coleção de <i>Leishmania</i> do Instituto Oswaldo Cruz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<i>g6pd</i>	Gene codificante da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase
<i>hsp70</i>	Gene da proteína de choque térmico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ICB, USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência indireta
IMT, SP	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
<i>its1</i>	Gene do espaçador interno transcrito
<i>kDNA</i>	DNA de cinetoplasto
LB	Luria Bertani
LT	Leishmaniose tegumentar
LC	Leishmaniose cutânea localizada
LM	Leishmaniose mucosa
LCDif	Leishmaniose cutânea difusa
LRC	Leishmaniose recidiva cútis
N-N-N	Novy-Nicolle- McNeal
NET	Tampão NaCl-EDTA-Tris
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
q.s.p.	quantidade suficiente para
RFLP	Análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>)
RNAse	Ribonuclease
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TE	Tampão Tris- EDTA
TELT	Tris- HCl EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade
UV	Luz ultravioleta
v	Volume

UNIDADES DE MEDIDA

cm	centímetro
g	grama
L	litro
m	metro
M	molar
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mol	moles
n	nano
pb	pares de base
p	pico
s	segundo
V	volt
$x g$	aceleração da gravidade ($\sim 9,8 \text{ m/s}^2$)
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	15
1.2	SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA.....	15
1.3	AGENTE ETIOLÓGICO DA LT NO BRASIL.....	17
1.4	VETORES.....	19
1.5	RESERVATÓRIOS E HOSPEDEIROS VERTEBRADOS	19
1.6	CICLO DE VIDA DAS LEISHMÂNIAS	20
1.7	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LT NO BRASIL	23
1.8	DIAGNÓSTICO DE LT NO BRASIL	25
1.8.1	<i>Diagnóstico clínico-epidemiológico.</i>	25
1.8.2	<i>Diagnóstico diferencial</i>	26
1.8.3	<i>Diagnóstico laboratorial</i>	26
1.8.3.1	<i>Testes parasitológicos</i>	27
1.8.3.1.1	<i>Pesquisa direta do parasito por microscopia</i>	27
1.8.3.1.2	<i>Isolamento e cultivo in vitro</i>	28
1.8.3.1.3	<i>Isolamento in vivo</i>	29
1.8.3.2	<i>Exames imunológicos</i>	29
1.8.3.2.1	<i>Intradermorreação de Montenegro (IDRM)</i>	29
1.8.3.3	<i>Exames sorológicos</i>	30
1.8.3.3.1	<i>Imunofluorescência Indireta (IFI) e ELISA</i>	30
1.8.3.4	<i>Exames moleculares</i>	32
1.8.3.4.1	<i>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</i>	32
2	OBJETIVOS.....	37
2.1	OBJETIVO GERAL:.....	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	37
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	38
3.2	ORGANISMOS DE REFERÊNCIA UTILIZADOS.....	38
3.3	TRIAGEM DE PACIENTES.....	39
3.3.1	<i>Crítérios de inclusão e exclusão de pacientes e suas amostras no grupo de estudo</i>	40
3.3.2	<i>Controles negativos</i>	40
3.3.3	<i>Dados complementares dos pacientes</i>	40
3.4	COLETA DE FRAGMENTOS DE LESÕES CUTÂNEAS OU MUCOSAS.....	40
3.5	EXAMES LABORATORIAIS PARA O DIAGNÓSTICO DE LT	41
3.5.1	<i>Microscopia</i>	42
3.5.2	<i>Isolamento e cultivo in vitro de parasitos</i>	42
3.5.3	<i>IDRM</i>	43
3.5.4	<i>Testes moleculares</i>	43
3.5.4.1	<i>Extração de DNA genômico</i>	43
3.5.4.1.1	<i>Extração de DNA genômico de formas promastigotas de parasitos</i> 43	
3.5.4.1.2	<i>Extração de DNA genômico de fragmentos de lesão de pacientes</i> 44	
3.5.4.1.3	<i>Extração de DNA genômico a partir de amostras de sangue</i>	44
3.5.4.2	<i>Quantificação e controle de qualidade do DNA extraído</i>	44
3.5.4.3	<i>Amplificação inespecífica de DNA genômico total (REPLI-G mini kit – QIAGEN)</i>	44
3.5.4.4	<i>Testes de detecção, especificidade e identificação das espécies de leishmânias</i>	45
3.5.4.4.1	<i>Oligonucleotídeos</i>	45
3.5.4.5	<i>Reações em cadeia da polimerase (PCR)</i>	46
3.5.4.5.1	<i>PCR beta- globina humana</i>	46

3.5.4.5.2	Testes de padronização (limiar de detecção e testes de especificidade).....	47
3.5.4.5.3	PCR- <i>kDNA</i> -RFLP- <i>HaeIII</i>	47
3.5.4.5.4	PCR- <i>its1</i> - RFLP- <i>HaeIII</i>	49
3.5.4.5.5	PCR- <i>hsp70</i> - RFLP- <i>HaeIII</i> / <i>BstUI</i>	50
3.5.4.5.6	PCR- <i>prp1</i>	51
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4	RESULTADOS	54
4.1	GRUPO DE ESTUDO E CONTROLE.....	54
4.2	EXAMES LABORATORIAIS DE ROTINA- MICROSCOPIA E IDR.....	55
4.3	ISOLAMENTO E CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE DE PARASITOS.....	56
4.4	PADRONIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE PCR.....	56
4.4.1	Limiar de detecção.....	56
4.4.2	Especificidade dos iniciadores.....	60
4.4.3	Diagnóstico de LT por PCR para <i>its1</i> , <i>hsp70</i> e <i>prp1</i>	61
4.4.4	Identificação de espécies de <i>Leishmania</i> por RFLP.....	65
4.4.4.1	PCR- <i>kDNA</i> -RFLP- <i>HaeIII</i>	65
4.4.4.2	PCR- <i>its1</i> - RFLP- <i>HaeIII</i>	66
4.4.4.3	PCR- <i>hsp70</i> - RFLP- <i>HaeIII</i> - <i>BstUI</i>	66
4.4.4.4	PCR- <i>prp1</i>	68
4.4.4.5	Identificação das espécies de leishmânias por PCR-RFLP em amostras de pacientes.....	68
4.4.4.5.1	PCR- <i>kDNA</i> -RFLP- <i>HaeIII</i>	68
4.4.4.5.2	PCR- <i>its1</i> -RFLP- <i>HaeIII</i>	69
4.4.4.5.3	PCR- <i>hsp70</i> -RFLP- <i>HaeIII</i> - <i>BstUI</i>	70
5	DISCUSSÃO	71
6	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS.....	87
	APÊNDICE A- PROCEDIMENTOS PARA COLETA DE MATERIAL PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	92
	APÊNDICE B- PROTOCOLO PARA ISOLAMENTO E CULTIVO <i>IN VITRO</i>	94
	APÊNDICE C- APOSTILA PARA DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO E MOLECULAR DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	95
	DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO E MOLECULAR DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	95
	APÊNDICE D- TABELAS DE CONTINGÊNCIA 2x2 DE CADA TESTE MOLECULAR ESTUDADO PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	120
	APÊNDICE E- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E RESULTADOS DE EXAMES CLÍNICOS DE ROTINA E MOLECULARES DO GRUPO CONTROLE.....	121
	APÊNDICE F- ARTIGO PUBLICADO SOBRE A APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE <i>kDNA</i> -PCR EM DNA PROVENIENTE DE BIÓPSIAS DE PACIENTES ATENDIDOS NO INSTITUTO EMÍLIO RIBAS.....	125
	ANEXO A- CARTA COM O PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS.....	126
	ANEXO B- CARTA DO PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO.....	127
	ANEXO C- CARTA DE CIÊNCIA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP.....	128

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose Tegumentar

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecciosa e não contagiosa, de transmissão vetorial, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A doença pode acometer a pele (leishmaniose cutânea localizada (LC)) e/ou as mucosas (leishmaniose mucosa (LM))^{1,2,3}. É uma infecção primariamente considerada uma zoonose, que acomete animais silvestres, mas pode acometer o homem e animais domésticos secundariamente¹. A doença cutânea clássica inicia-se com a formação de uma pápula no local da picada do vetor, que evolui para úlcera (única ou múltipla) indolor com fundo granulomatoso e borda infiltrada em moldura. No entanto, a doença pode apresentar outras manifestações clínicas, dependendo da espécie de parasito infectante e da resposta imunológica apresentada pelo indivíduo, o que pode dificultar o diagnóstico da doença. A LM pode ser secundária ou não à LC e caracteriza-se pela infiltração, ulceração e destruição dos tecidos da cavidade nasal, faringe e/ou laringe, perfuração do septo nasal e/ou palato, causando deformidades, cicatrizes marcantes e, traumas psicológicos ao indivíduo infectado¹. O tratamento da doença é realizado com antimoniais, como o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina e anfotericina B. Esses medicamentos são altamente tóxicos em concentrações elevadas podendo haver risco de arritmias cardíacas e pancreatite aguda. A cura é apenas clínica e o paciente deve ser acompanhado por período variável dependendo do prognóstico^{1,2,3}.

1.2 Situação Epidemiológica

Trata-se de uma doença subnotificada e com ampla distribuição geográfica. Nos últimos cinco anos, um milhão de casos de LT foram registrados mundialmente².

No entanto, estima-se que a incidência anual global apenas de LC seja de 0,7 a 1,3 milhão de casos⁴. A incidência de LM não foi calculada devido à escassez de dados publicados⁴.

A LT foi registrada em 88 países distribuídos em 4 continentes: América, Ásia, África e Europa^{1,2}. Segundo a Organização Mundial da Saúde², os casos de LT concentram-se em três regiões epidemiológicas: Américas, bacia Mediterrânea e Ásia ocidental (que compreende a região do Oriente Médio até a Ásia Central). Dados de registros da doença indicam que 70 a 75% dos casos de LT ocorrem em dez países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria. Os casos de LM concentram-se na Bolívia, Brasil e Peru, onde cerca de 90% dos casos mundiais são registrados².

No continente Americano há registros de casos de LT desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e do Uruguai¹. O Brasil foi o terceiro país do mundo, em número de casos notificados em 2013, com 18.226 registros, o que corresponde a 40,8% dos casos notificados nas Américas e a 9,8% dos registros mundiais².

A análise dos casos de LT registrados no Brasil em 2013, mostrou que a doença foi notificada em todas as unidades federadas. A região norte registrou 8.407 casos em 2013 (46,12% dos registros no país), seguido da região nordeste com 5.355 (29,4%); centro-oeste com 2.922 casos (16,03%); sudeste com 1.150 (6,3%); sul com 296 (1,62%) e 96 casos (0,52%) foram registrados sem identificação de local provável de infecção⁵. Os dados de LT no Brasil, coletados no período de 2009 a 2013 mostram que 21.000 casos, em média, são registrados por ano, com coeficiente de incidência de 11,3 casos/100.000 habitantes. A região norte apresenta o maior coeficiente de incidência (54,4 casos/100.000 habitantes), seguida das regiões

centro-oeste (22,9 casos/100.000 habitantes) e nordeste (14,2 casos/100.000 habitantes)^{5,6}.

No Brasil, embora a notificação da doença ter caráter compulsório e uma média de incidência anual de 21.000 casos, Alvar et al.⁴ estimam que este número seja significativamente maior, variando entre 72.800 a 119.600 casos.

Essa diferença entre a incidência estimada e o número de casos notificados pode ser devido á ocorrência da doença em áreas florestais, rurais e periurbanas, afetando a população com baixo poder aquisitivo, desinformada sobre a doença e com acesso restrito a instituições de saúde pública. Assim, os pacientes procuram assistência médica apenas em casos graves, como a forma mucosa, disseminada ou com a reincidência da lesão. Deste modo, muitos casos de LT que evoluem para cura espontânea não são notificados. Há também uma parcela dos casos que são diagnosticados como outras enfermidades devido à falta de informação dos profissionais da rede de saúde e também devido à ausência de laboratórios próximos para realizar os exames laboratoriais necessários para confirmação da suspeita clínica da doença^{1,7}.

1.3 Agente etiológico da LT no Brasil

A LT é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que é um parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear^{1,3}.

Taxonomicamente o parasito é classificado da seguinte forma: Reino Protista; Sub-reino Protozoa; Filo Sarcomastigophora; Subfilo Mastigophora; Classe: Zoomastigophorea; Ordem Kinoplastida; Subordem Trypanosomatina; Família Trypanosomatidae; Gênero *Leishmania*⁸. O gênero foi subdividido por Lainson e Shaw⁸ em dois subgêneros baseados na localização das formas promastigotas no trato digestório do inseto vetor. As espécies que apresentam desenvolvimento na

porção anterior do tubo digestório foram agrupadas no subgênero *Leishmania*. Já as espécies do subgênero *Viannia*, apresentam desenvolvimento na porção posterior do tubo digestório. Há ainda o subgênero *Sauroleishmania*, que compreende espécies que parasitam exclusivamente lagartos⁹.

Leishmânias são organismos diploides que se reproduzem de forma assexual por fissão binária. Apresentam suas informações genéticas armazenadas em dois compartimentos: no núcleo (na forma de DNA nuclear) e no cinetoplasto (sob forma de *kDNA*). Apresentam genoma nuclear haploide, organizado em 34-36 cromossomos com tamanho variável entre 0,3 e 2,5 Mb. A variação do número de cromossomos é devido à fenômenos de fusão¹⁰. O *kDNA* é formado por uma rede de DNAs circulares concatenados de dois tipos: maxicírculos (20-40 Kb) presentes em dezenas de cópias e minicírculos (0,5- 10 Kb) com milhares de cópias¹⁰. Jara et al¹¹, estimaram o peso molecular de DNA de um parasito de leishmânia em 83,15 fg baseando-se no genoma haploide sequenciado de *L. (V.) braziliensis* com 32 Mb, cerca de 70 fg para seu genoma diploide mais um estimado de 15,8% de *kDNA* correspondente à 13,15 fg.

No Brasil, até o momento, sete espécies de leishmânias foram relacionadas à forma cutânea da doença: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenberg*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*^{1,12}.

Essas espécies apresentam distribuição geográfica distintas: a região Norte apresenta todas as espécies já identificadas, no restante do país verifica-se a predominância de infecções por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*¹.

1.4 Vetores

A LT é transmitida pela picada de fêmeas de flebotomíneos, insetos pertencentes à Ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia*. As principais espécies envolvidas na transmissão da doença no Brasil são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei*. As espécies de vetores apresentam distribuição geográfica distinta¹. Os hábitos dos vetores e preferências pelo sangue de determinados animais podem interferir no ciclo de transmissão de determinadas espécies de leishmânias. As espécies de vetoras de *L. (L.) amazonensis*, como por exemplo: *Lu. flaviscutellata*, *Lu. reducta*, *Lu. olmeca nociva*, são pouco antropofílicas, o que pode ocasionar uma menor frequência de infecção em humanos por esta espécie de parasito¹.

1.5 Reservatórios e Hospedeiros vertebrados

Os hospedeiros e reservatórios do parasito são distintos em cada região do país, obedecendo seus próprios hábitos, bem como dos flebotomíneos presentes em cada região. Espécies de roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres já foram registrados como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais do parasito, principalmente em áreas florestais. Em áreas urbanas e rurais há registros de infecções por leishmânia em animais domésticos como: canídeos, felídeos e equídeos, entretanto, o papel epidemiológico destes animais ainda não está bem esclarecido e, assim, são considerados hospedeiros acidentais do parasito¹.

A Tabela 1 resume as espécies de vetores e hospedeiros vertebrados envolvidos no ciclo de vida de cada espécie de leishmânia, a distribuição geográfica dos parasitos e as principais características clínicas das lesões em humanos.

1.6 Ciclo de vida das leishmânias

O ciclo biológico das leishmânias é heteróxico, ou seja, uma parte de seu ciclo ocorre em um hospedeiro vertebrado e a outra em um hospedeiro invertebrado. Apresenta-se em duas formas principais: no hospedeiro invertebrado, inseto vetor, o parasito é encontrado na forma flagelada ou promastigota; já nos tecidos dos vertebrados, observa-se a forma aflagelada do parasito ou amastigota¹⁻³.

No Brasil, o ciclo de transmissão do parasito varia de acordo com a região geográfica, envolvendo diferentes espécies de vetores, reservatórios e hospedeiros. Apesar das particularidades, o ciclo de transmissão das leishmânias inicia-se pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas. Durante a picada, as formas infectantes do parasito (promastigota metacíclica) são inoculados na pele do hospedeiro vertebrado junto com a saliva de flebotomíneos. Na pele, o parasito é fagocitado por macrófagos, resistem à ação das enzimas lisossomais e formam um vacúolo parasitóforo no macrófago. O parasito diferencia-se na forma amastigota (sem flagelo) e multiplica-se por divisão binária, até a ruptura da célula quando ocorre a liberação das formas amastigotas no meio intercelular, as quais serão fagocitadas por outros macrófagos. As formas amastigotas não internalizadas serão destruídas no meio extracelular pela resposta inata do hospedeiro e as partículas antigênicas produzidas podem ser utilizadas no processo de reconhecimento antigênico. A maneira como o sistema imune do paciente reage à infecção por leishmânia é o fator que determinará a evolução para cura espontânea, forma autolimitada ou progressão da doença para formas graves, como a LM, ou forma disseminada. A fêmea do flebotomíneo ao picar um hospedeiro vertebrado infectado, ingere juntamente com o sangue as formas amastigotas do parasito contidas no interior dos macrófagos. As formas amastigotas são liberadas no tubo digestivo do inseto, onde se diferenciam nas formas promastigotas ficando aderidas no epitélio do intestino. Nesse local, os

Tabela 1- Características epidemiológicas das leishmânias associadas a leishmaniose tegumentar humana no Brasil.

Espécies de Leishmânia	Distribuição geográfica		Hospedeiros	Vetores	Características das lesões
	América do Sul	Brasil			
<i>L. (L.) amazonensis</i>	Brasil, Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Paraguai	Predomínio na região Amazônica (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins, Maranhão). Há registros em Goiás, Minas Gerais, São Paulo Bahia, Paraná e Santa Catarina.	Rodentia: <i>Oryzomys</i> , <i>Neacomys</i> , <i>Nectomys</i> e <i>Dasyprocta</i> . Marsupiais: <i>Marmosa</i> , <i>Metachirus</i> , <i>Didelphis</i> e <i>Philander</i> . Carnívoro: <i>Cerdocyon thous</i>	<i>Lutzomyia (Nyssomia) flaviscutellata</i> , <i>Lu. olmeca nociva</i> , <i>L. reducta</i> .	Lesões cutâneas ulceradas localizadas, leishmaniose cutânea difusa (LCD) e forma disseminada. Lesões múltiplas não ulceradas em placas ou nódulos.
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Brasil, Guianas, Venezuela, Peru, Equador	Norte da bacia Amazônica (Amapá, Acre, Roraima, Amazonas, Pará)	<i>Choloepus didactylus</i> , <i>Tamandua tetradactyla</i> , <i>Didelphis marsupialis</i> , <i>Proechimys guyanensis</i> .	<i>Lu. umbratilis</i> , <i>Lu. andaluzei</i> , <i>Lu. whitmani</i>	Lesões cutâneas ulceradas únicas ou múltiplas, derivadas de picadas simultâneas e pouco dolorosas. Acometimento em tecidos mucosos raro. Recidivas frequentes.
<i>L. (V.) lainsoni</i>		Região Amazônica (Pará, Acre, Rondônia)	<i>Agouti paca</i>	<i>Lu. ubiquitalis</i>	Lesões cutâneas simples
<i>L. (V.) shawi</i>		Sul do Rio Amazonas (Pará e Maranhão)	<i>Cebus apella</i> , <i>Chiropotes satanas</i> , <i>C. didactylus</i> , <i>Bradypus tridactylus</i> , <i>Nasua nasua</i> .	<i>Lu. whitmani</i>	Lesões cutâneas simples ou lesões múltiplas ulceradas e nodulares.
<i>L. (V.) naiffi</i>		Pará, Amazonas, Maranhão	<i>Dasyopus novemcinctus</i> (tatu)	<i>Lu. squamiventris</i> , <i>Lu. paraensis</i> , <i>Lu. ayrosa</i> .	Pequenas lesões cutâneas simples e ulceradas
<i>L. (V.) lindenberg</i>		Pará	desconhecido	<i>Lu. (Nyssomia) antunesi</i>	
<i>L. (V.) braziliensis</i>	de Belize ao norte da Argentina	Em todos os estados brasileiros	Rodentia: <i>Akodon</i> , <i>Dasyprocta</i> , <i>Kannabateomys</i> , <i>Bolomys lasiurus</i> , <i>Nectomys squamipes</i> , <i>Agouti paca</i> , <i>Rattus</i> , <i>Proechimys</i> , <i>Oryzomys</i> , <i>Rhipidomys</i> , <i>Nectomys</i> e <i>Necomys</i> . Marsupiais: <i>Didelphis</i> . <i>Felis catus</i> *, <i>Canis familiaris</i> *, <i>Equus caballus</i> *, <i>Equus asinus</i> *	<i>Lu. whitmani</i> , <i>Lu. wellcomei</i> , <i>Lu. intermedia</i> , <i>Lu. complexa</i> , <i>Lu. migonei</i> , <i>Lu. Neivai</i>	Lesões ulceradas cutânea, única ou múltipla, pode evoluir para Leishmaniose Mucosa (LM) e comprometer mucosas nasofaríngeas.

Fontes: Brasil, 2007; Costa, 2011

promastigotas se proliferam e se diferenciam-se para a forma promastigota metacíclica. As formas promastigotas metacíclicas infectantes migram para a faringe e cavidade bucal do flebotomíneo, formando um tampão, que é expelido junto com a saliva durante o repasto sanguíneo, podendo infectar novo hospedeiro vertebrado^{1,12}.

No Brasil, o ciclo de transmissão do parasito varia de acordo com a região geográfica, envolvendo diferentes espécies de vetores, reservatórios e hospedeiros. Apesar das particularidades, o ciclo de transmissão das leishmânias inicia-se pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas. Durante a picada, as formas infectantes do parasito (promastigota metacíclica) são inoculados na pele do hospedeiro vertebrado junto com a saliva de flebotomíneos. Na pele, o parasito é fagocitado por macrófagos, resistem à ação das enzimas lisossômicas e formam um vacúolo parasitóforo no macrófago. O parasito diferencia-se na forma amastigota (sem flagelo) e multiplica-se por divisão binária, até a ruptura da célula quando ocorre a liberação das formas amastigotas no meio intercelular, as quais serão fagocitadas por outros macrófagos. As formas amastigotas não internalizadas serão destruídas no meio extracelular pela resposta inata do hospedeiro e as partículas antigênicas produzidas podem ser utilizadas no processo de reconhecimento antigênico. A maneira como o sistema imune do paciente reage à infecção por leishmânia é o fator que determinará a evolução para cura espontânea, forma autolimitada ou progressão da doença para formas graves, como a LM, ou forma disseminada. A fêmea do flebotomíneo ao picar um hospedeiro vertebrado infectado, ingere juntamente com o sangue as formas amastigotas do parasito contidas no interior dos macrófagos. As formas amastigotas são liberadas no tubo digestivo do inseto, onde se diferenciam nas formas promastigotas ficando aderidas no epitélio do intestino. Nesse local, os promastigotas se proliferam e se diferenciam-se para a forma promastigota metacíclica. As formas promastigotas metacíclicas infectantes migram para a faringe

e cavidade bucal do flebotomíneo, formando um tampão, que é expelido junto com a saliva durante o repasto sanguíneo, podendo infectar novo hospedeiro vertebrado^{1,12}.

1.7 Manifestações clínicas da LT no Brasil

As manifestações clínicas e a progressão da doença podem variar de acordo com a resposta imunológica do paciente e com as características patogênicas da espécie e cepa de leishmânia infectante^{1,12,13}.

Na forma clássica de LC, observada em 85% dos casos notificados, os pacientes apresentam inicialmente um eritema no local da picada do flebotomíneo que evolui para uma lesão única, arredondada ou ovalada, ulcerada, com fundo granulomatoso de bordas elevadas e indolor. O tempo para o aparecimento da lesão pode variar de duas semanas a dois anos, sendo em média de dois a três meses. Até o momento, todas as espécies de leishmânia dermatrópicas identificadas no Brasil, podem ocasionar esta manifestação clínica, denominada leishmaniose cutânea localizada. Observa-se que nesta forma, a imunidade celular do indivíduo é preservada e a evolução tende a ser benigna, com cura espontânea deixando cicatrizes no local da lesão^{1,2,12}. No entanto, há registros de outras formas clínicas como lesões nodulares, pápulas, lesões cutâneas em placas e verrucosas¹.

A forma cutânea disseminada é caracterizada pela presença de numerosas lesões pequenas com aspecto papular, por vezes, acneiforme, disseminadas pelo tegumento da face e tronco, distantes do local da picada. Estima-se que 2% dos casos de LT registrados no Brasil apresentem características dessa manifestação clínica. A lesão primária ocorre no local da picada do inseto com características semelhantes a de lesão clássica da LC, no entanto, ocorre a disseminação do parasito por via linfática ou hemática causando o surgimento de inúmeras lesões espalhadas pelo corpo. O paciente pode apresentar lesões em mucosas (30% dos

casos) e também manifestações sistêmicas como: febre, mal-estar, dores musculares, emagrecimento e anorexia. A leishmaniose disseminada está relacionada com a infecção por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*^{1,12,13}.

A leishmaniose cutânea difusa (LCDif) constitui uma forma clínica rara, associada com infecção por *L. (L.) amazonensis* em indivíduos que apresentam resposta imune celular deficiente contra o parasito. Nesta forma, há acentuada proliferação dos parasitos e disseminação da infecção. As lesões raramente ulceram e apresentam-se como placas, nódulos, tubérculos por vezes vegetantes por grandes extensões do tegumento^{1,12,13}.

A leishmaniose mucosa (LM) é a forma mais grave das manifestações tegumentares da doença devido ao comprometimento das mucosas nasal-oral com possível mutilação e cicatrizes permanentes. A doença está relacionada com a infecção por *L. (V.) braziliensis*, espécie predominante na América Latina, e a uma resposta imune celular exacerbada do paciente. O tempo médio entre a infecção inicial e a manifestação dos sintomas de LM é de cinco anos. As lesões iniciais de LM são assintomáticas – podendo ser secundária a LC, estimando-se que 3 a 5% dos casos de LC podem evoluir para a LM⁴. Não há cura espontânea nesta forma da doença, podendo ocorrer recidivas após o tratamento^{1,2,13}.

Além dessas manifestações clínicas deve-se ter especial atenção aos casos de coinfeção LT com vírus da imunodeficiência humana (HIV), uma vez que a imunodepressão ocasionada pelo vírus HIV pode ocasionar lesões atípicas caracterizadas por máculas e pápulas disseminadas em áreas não expostas às picadas ocasionando uma evolução clínica atípica como, por exemplo, a visceralização da LT¹⁴⁻¹⁷.

1.8 Diagnóstico de LT no Brasil.

O diagnóstico da LT no Brasil é realizado segundo critérios clínico-epidemiológicos, confirmados por exames laboratoriais^{1,5,7,18,19}. Os critérios clínicos epidemiológicos são: indivíduo proveniente de áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar, com presença de úlcera cutânea com fundo granulomatoso e bordas infiltradas em moldura, ou úlcera na mucosa nasal, com ou sem perfuração, ou perda do septo nasal, com possível comprometimento de lábios, palato e nasofaringe^{1,2,3,19}. Os exames laboratoriais empregados rotineiramente para LT são: pesquisa direta de parasitos, intradermorreação de Montenegro (IDRM) e exames histopatológicos^{1,2,12,18}.

Exames sorológicos e moleculares são empregados de forma complementar e opcional aos outros exames laboratoriais visando a confirmação do diagnóstico^{1,2,12,18}.

Sempre que possível, o diagnóstico das leishmanioses deve abranger outros aspectos tais como: o estado imunológico do paciente, ou a espécie do parasito infectante, com o objetivo de auxiliar no manejo do paciente (tratamento, monitoramento, prognóstico), bem como na orientação das ações de vigilância e controle da LT^{1,7}.

1.8.1 Diagnóstico clínico-epidemiológico.

O paciente é considerado suspeito de LT quando apresentar alguma das manifestações clínicas descritas no item 1.7 acima e relatar residência, deslocamento ou procedência de locais com transmissão confirmada da doença^{1,18}.

Devido à grande variedade de manifestações clínicas da LT, algumas delas compartilhadas com outras doenças cutâneas, o Ministério da Saúde do Brasil

recomenda a realização do diagnóstico diferencial para outras doenças, e de exames laboratoriais específicos para LC e LM para a confirmação do diagnóstico de LT¹.

1.8.2 Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial da LT deve ser realizado com as seguintes doenças (em casos de LC): sífilis, hanseníase, tuberculose, micobacterioses atípicas, paracoccidioidomicose, histoplasmose, lobomicose, esporotricose, cromoblastomicose, piodermites, rinoscleroma, granuloma facial de linha média, sarcoidose, lúpus eritematoso discóide, psoríase, infiltração linfocitária benigna de Jessner, vasculites, úlceras de estase venosa, úlceras decorrentes da anemia falciforme, picadas de insetos, granuloma por corpo estranho, ceratoacantoma basocelular, carcinoma espinocelular, histiocitoma, linfoma cutâneo e tumores cutâneos. Já com relação aos casos de LM o diagnóstico diferencial deve ser realizado com: paracoccidioidomicose, carcinoma epidermoide, carcinoma basocelular, linfomas, rinofima, rinosporidiose, entomofotoromicose (zigomicose), hanseníase virchowiana, sífilis terciária, perfuração septal traumática ou por uso de drogas, rinite alérgica, sinusite, sarcoidose, granulomatose de Wegner ¹.

1.8.3 Diagnóstico laboratorial

Devido à complexidade da doença, a escolha do exame laboratorial a ser realizado para o diagnóstico da LT deve considerar aspectos clínicos da lesão e do paciente, uma vez que a sensibilidade das diferentes técnicas costuma ser reduzida quanto maior o tempo de infecção, além de também depender da localização da lesão e condições do sistema imunológico do paciente. No Brasil, os exames laboratoriais para LT podem ser classificados em três grupos: testes parasitológicos, imunológicos e moleculares^{1,7,18}.

1.8.3.1 Testes parasitológicos

1.8.3.1.1 Pesquisa direta do parasito por microscopia

Na visualização direta do parasito nas formas amastigotas, lâminas são preparadas por aposição de fragmentos de lesão cutânea ou mucosa ou preparadas com material “raspado” das bordas das úlceras de pele ou mucosa, coradas pelo método de Romanovsky, Giemsa, Leishmania, Wright ou kits de coloração instantânea^{1,7,12,18}. Constitui o exame de primeira escolha, por ser o mais rápido, de menor custo e de fácil execução, embora seja necessário um examinador experiente^{1,7}. As formas amastigota possuem de 4 a 10 µm de diâmetro, núcleo excêntrico e cinetoplasto evidente, são evidenciadas no interior dos macrófagos do hospedeiro. A positividade é variável conforme o tipo e local da lesão, espécie infectante, tempo de infecção e experiência do examinador⁷, em geral não ultrapassando 50%. Nota-se que em lesões causadas por *L. (V.) braziliensis* há pouco parasitismo, ao contrário das causadas por *L. (L.) amazonensis*, em que há parasitismo abundante, principalmente nas LCDif.

Quando a técnica é realizada com material coletado de lesões mucosas, nota-se que raramente os parasitos são observados, devido ao grande número de outros microrganismos presentes neste tecido e do tipo de resposta celular apresentada nos pacientes com LM. Estudos apontam ainda que a positividade da técnica é maior em lesões recentes (com menos de 3 meses de evolução), uma vez que a carga parasitária de leishmânia decresce na lesão cutânea conforme esta progride e também devido à ocorrência de contaminações secundárias no local^{1,7,12,17}.

1.8.3.1.2 Isolamento e cultivo *in vitro*

O isolamento e cultivo *in vitro* do parasito são realizados a partir da adição de material aspirado ou fragmentos de lesão de pele ou mucosa em meios de cultivo apropriados - Novy-Nicolle- Mc Neal (NNN), *Liver Infusion Triptose* (LIT), *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM), Schneider's e Evans- entre 24°C e 26°C. O Ministério da Saúde do Brasil¹ recomenda que o material coletado seja colocado em solução salina tamponada, mantido à temperatura ambiente e enviado ao laboratório até 24 horas após a coleta, para que os parasitos sejam cultivados. O material biológico pode ser tratado com antibióticos previamente ao cultivo para eliminar microrganismos contaminantes e facilitar o isolamento do parasito. O cultivo é examinado semanalmente à procura de formas promastigotas do parasito. O tratamento da lesão prévio aa coleta do material biológico pode diminuir a densidade de parasitos e, assim, interferir no tempo de incubação e na sensibilidade do método, ou até mesmo causar o não crescimento do parasito. Em culturas realizadas antes do tratamento das lesões do paciente, a positividade ocorre geralmente em duas semanas, e em culturas realizadas pós-tratamento (em casos onde há recidivas da doença) o período para a obtenção de resultados positivos pode ser maior. Assim, recomenda-se observar o cultivo por quatro semanas antes de se liberar o resultado negativo (ausência de parasitos no cultivo). A positividade da técnica varia também com o tipo de material biológico empregado. Estudos apontam que, quando a técnica é empregada com material aspirado de lesões cutâneas a positividade varia entre 60 e 70%, entretanto, a positividade utilizando material obtido de lesões mucosas é menor devido ao alto índice de contaminação por fungos e bactérias^{7,18}.

Essa técnica não é empregada na rotina diagnóstica de serviços públicos de saúde devido ao seu alto custo, baixa sensibilidade devido à contaminação por outros microrganismos e por requerer longo período para a obtenção de resultados¹.

A vantagem desta técnica é que, quando bem-sucedida, pode-se confirmar o diagnóstico de LT e o isolado pode ser utilizado para caracterização da espécie do parasito infectante por técnicas isoenzimáticas, marcação de anticorpos específicos ou por técnicas biomoleculares^{7,18}.

1.8.3.1.3 Isolamento *in vivo*

Neste método, inocula-se uma solução preparada com solução salina estéril e material biológico macerado, obtido de biópsias ou de raspado de lesão do paciente com suspeita de LT, no focinho ou patas de hamster (*Mesocricetu auratus*). O resultado é positivo quando observa-se, após cerca de um mês, a formação de lesão cutânea no animal. A suspeita de LT só pode ser descartada após observação do animal por três a seis meses, e ausência de formação de lesão cutânea onde a substância foi inoculada. Essa técnica, apesar de sua elevada sensibilidade, é pouco empregada devido a alta complexidade do procedimento e do alto custo^{1,7,18}.

1.8.3.2 Exames imunológicos

1.8.3.2.1 Intradermoreação de Montenegro (IDRM)

Neste exame, avalia-se a hipersensibilidade celular tardia do paciente aos antígenos de leishmânia. O antígeno (solução contendo formas promastigotas de leishmânia) é aplicado na face anterior do braço esquerdo e após 48 horas realiza-se a leitura do teste. O paciente é considerado positivo quando apresentar diâmetro de endureção igual ou superior a cinco milímetros. O resultado positivo deve ser interpretado como indicador de exposição prévia aos parasitos do gênero *Leishmania*, mas não indica quando esta exposição ocorreu. A IDRM é o exame

recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil para o diagnóstico da LM, pois nesta manifestação clínica, a resposta celular é exacerbada, com endureção de vários centímetros, podendo ocorrer ulceração e necrose local^{1,7,18}.

Resultados negativos (ausência de reação ou endureção com diâmetro inferior a cinco milímetros) indicam que o indivíduo não apresenta, ou apresenta fraca resposta celular contra o parasito, mas não significa que este indivíduo não esteja infectado com leishmânia. A IDRМ também pode ser negativa nas primeiras quatro a seis semanas após o surgimento da lesão cutânea. Assim, apenas o resultado negativo para a IDRМ não descarta o diagnóstico de LT, sendo necessário outro exame laboratorial para a confirmação do resultado¹⁹. Além disso, estudos já demonstraram que a IDRМ é caracteristicamente negativa na LCDif, em pacientes com leishmaniose visceral (LV) e em pacientes com coinfeção HIV-LT^{1,17}.

Há relatos de resultados falso-positivos em indivíduos alérgicos a componentes utilizados para diluir o antígeno, em casos em que o paciente realizou a IDRМ pela segunda vez, em indivíduos com doença de Chagas (devido à reação cruzada entre os antígenos de leishmânia e anticorpos anti-*Trypanossoma cruzi*), e em indivíduos provenientes de áreas endêmicas da LT que não apresentam a doença^{1,7}.

1.8.3.3 Exames sorológicos

1.8.3.3.1 Imunofluorescência Indireta (IFI) e ELISA

Os exames sorológicos baseiam-se na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes no soro dos pacientes. A resposta imune humoral dos pacientes com LT é geralmente de intensidade moderada¹.

A IFI apresenta sensibilidade variável de acordo com a espécie de parasito infectante, com o tempo de evolução da doença e com o tipo de lesão, podendo chegar a cerca de 70% em pacientes com lesões cutâneas ulceradas causadas por *L. (V.) braziliensis* no primeiro ano da doença, porém com sensibilidade menor em pacientes com lesões ocasionadas por *L. (V.) guyanensis*. Títulos mais altos estão relacionados à presença de lesões cutâneas múltiplas e/ou mucosas, existindo, no entanto, casos com lesões múltiplas e resultados persistentemente negativos. Há relatos de resultados falso-positivos em pacientes com outras doenças tais como doença de Chagas, esporotricose, paracoccidiodomicose e, de resultados falso-negativos em pacientes com LT. Desta maneira, o Ministério da Saúde do Brasil, recomenda que a IFI não seja utilizada como critério laboratorial único para o diagnóstico de LT^{1,7}.

A técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) é utilizada apenas para pesquisa, mas pode auxiliar na detecção de anticorpos IgG, IgM e outros isotipos de imunoglobulinas anti-*Leishmania* que podem ser utilizadas como marcadores de prognóstico. No entanto, os títulos são baixos e a positividade fica em torno de 50%, maior na LM e na LCDif e menor na LC. Os títulos tendem a ser mais elevados nas fases iniciais da doença e nos casos mais graves. A positividade também depende da espécie envolvida, por exemplo, a infecção por *L. (V.) guyanensis* apresenta títulos menores. A sorologia, quando positiva, pode ser utilizada como controle da cura, uma vez que a negatificação dos títulos está associada à cicatrização das lesões^{7,13}.

A tabela 2 resume os principais parâmetros que devem ser avaliados na seleção do teste laboratorial voltado ao diagnóstico de LT, como: as manifestações clínicas da LT, presença de parasitos na lesão, resposta celular e produção de anticorpos.

1.8.3.4 Exames moleculares

1.8.3.4.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é considerada uma ferramenta promissora para o diagnóstico das leishmanioses. Atualmente, a PCR é empregada apenas para fins de pesquisa, embora tenha sido útil quando empregado como um segundo teste laboratorial para a confirmação do diagnóstico de LT juntamente com um teste clássico (como: pesquisa direta ou IDRM). Este método molecular apresenta algumas vantagens quando comparado às técnicas parasitológicas, como por exemplo: 1) elevada sensibilidade (mesmo quando a carga parasitária é baixa), 2) maior especificidade pois utiliza sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) específicas para o gênero *Leishmania*, 3) possibilidade de utilização de diversos tipos de material biológico (raspado de lesão, material parafinado ou fragmentos de lesões cutâneas e mucosas), podendo ser coletado em diferentes estágios da doença, com presença ou não de infecções secundárias e de pacientes previamente tratados para LT^{7,18,20,21}.

Outra vantagem da técnica está relacionada à facilidade de coleta, manutenção e transporte do material biológico a ser utilizado, por exemplo: um raspado de lesão coletado em papel de filtro que pode ser transportado à temperatura ambiente sem meio de cultivo específico ou antibióticos, possibilitando redução de custo e espaço, além de ser um método menos invasivo e traumático do que a biópsia de lesão com "punch"^{7,18}. Ademais, é possível, dependendo do marcador molecular utilizado, a identificação da espécie de leishmânia infectante, o que não é possível por exames convencionais, devido à grande semelhança morfológica existente entre as espécies de leishmânia^{20,22--29}.

Atualmente, o método de referência para a identificação de espécies do gênero *Leishmania* é a eletroforese de isoenzimas do parasito, técnica muito

Tabela 2- Características clínicas, parasitológicas, de resposta celular e humoral nas diferentes formas clínicas de leishmaniose tegumentar no Brasil.

Manifestação clínica	Leishmaniose Cutânea Localizada	Leishmaniose Cutânea Disseminada	Recidiva Cútis	Leishmaniose Cutânea Difusa	Leishmaniose Mucosa
Incidência	85%	2%			3 a 5%
Agente etiológico	Todas as espécies dermatópicas	<i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
Características da lesão	Lesão única ou múltipla, ulcerada indolor, arredondada, com bordas delimitadas, base eritematosa, infiltrada com fundo avermelhado	Múltiplas lesões acneiformes	Reativação da infecção previamente curada.	Formação de placas e nodulações não ulceradas em grandes extensões do tegumento	Lesões destrutivas nas mucosas das vias superiores
Imunidade Celular	++	Variável	Positiva	-	++++
Presença de parasitos na lesão	++	+		++++	+
Macrófagos	++			++++	+
Títulos de anticorpos	+	++		++++	+++
Resposta terapêutica	Boa	Satisfatória	Fraca ou Ausente	Fraca	Boa
Prognóstico	auto-cura ou evolução para outras formas	LM e comprometimento sistêmico	Cicatrização parcial da lesão com reativação possível	Raro comprometimento nasal	

- Ausência; Presença: + leve; ++ moderada; +++ intensa; ++++ exacerbada

Fonte: Brasil, 2007; Costa 2011

trabalhosa, de custo elevado, que requer o cultivo e isolamento prévios do parasito, tornando-a inviável para o diagnóstico de rotina.

A identificação da espécie de leishmânia infectante é importante, pois existem particularidades de mecanismos imunopatogênicos na relação hospedeiro-parasito que são específicas de determinada espécie e que, como vimos anteriormente, ocasionam diferentes manifestações clínicas, bem como respostas terapêuticas distintas que requerem conduta terapêutica e acompanhamento específicos¹³. Além disso, a identificação das espécies pode auxiliar em estudos epidemiológicos que contribuem para a elaboração de estratégias de controle da LT em cada região endêmica e, associados à pesquisa clínica, podem auxiliar no desenvolvimento de novas drogas leishmanicidas.

Atualmente, uma série de iniciadores para diferentes sequências gênicas de leishmânia foram descritos na literatura e empregados na técnica de PCR, sendo inclusive capazes de diferenciar as espécies do parasito. Entre eles, podemos destacar: 1) Iniciadores da sequência de DNA dos mini-círculos do cinetoplasto (*kDNA*)²⁶, cujo produto de amplificação pode ser fragmentado por uma enzima de restrição para diferenciar *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*^{20,26}; 2) Iniciadores para o gene que codifica a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (*g6pd*)²⁹, possibilitando a diferenciação dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, e a distinção das espécies do subgênero *Viannia*; 3) Iniciadores para o gene que codifica a proteína de choque térmico (*hsp70*) (*heat shock protein*) que permite a identificação de espécies associadas à LT²²⁻²⁷; 4) Iniciadores da sequência de regiões dos espaçadores internos transcritos de DNA ribossomal (*its1*) que permitem a distinção de espécies de leishmânia, após PCR e digestão enzimática dos produtos de amplificação³⁰.

Apesar da PCR apresentar resultados promissores e de grande contribuição ao diagnóstico da leishmaniose, por ser sensível e específica, existe o risco de ocorrerem resultados falso-positivos em decorrência de contaminações e, por isso, para a execução dos testes é importante que exista uma infra-estrutura adequada para a realização de cada etapa da técnica, além de técnicos experientes, o que acaba elevando o custo do exame^{1,20}. Outro obstáculo ao uso da PCR como rotina laboratorial é a falta de padronização e validação de um protocolo operacional padrão que seja eficaz em todo o país.

Tendo em vista a dificuldade de diagnóstico da LT em nosso país, devido a complexidade da doença que deve ser avaliada em todos os seus aspectos, quais sejam epidemiológico, clínico, resposta imunológica do paciente e espécie do parasito infectante, decidimos neste trabalho, padronizar e validar quatro reações de PCR visando o diagnóstico e a identificação dos parasitos infectantes em amostras biológicas de pacientes com LT, bem como comparar o desempenho dos diferentes testes moleculares em relação aos métodos tradicionais empregados na rotina diagnóstica.

Assim, pretendemos utilizar 3 pares de iniciadores descritos acima (*kDNA*, *its1* e *hsp70*), além de um quarto par de iniciador dirigido contra uma glico-proteína P de membrana (*prp1*) e relacionada com a resistência a pentamidina que foi descrita pelo nosso grupo^{31,32}. No texto abaixo, resumimos as principais características e breve revisão literária de cada alvo.

O cinetoplasto de leishmânia é uma organela que contém o DNA mitocondrial do parasito encontrada na base do flagelo³³. O cinetoplasto é constituído por uma densa rede de DNA extra-cromossômico (*kDNA*) e as sequências são denominadas mini e maxicírculos. Minicírculos são pequenas moléculas circulares de cerca de 800 pb, contendo uma região conservada de 120 nucleotídeos, e uma região muito

variável que codifica moléculas de RNA envolvidas na edição de genes dos maxicírculos³⁴. A vantagem de se utilizar minicírculos em diagnóstico é o seu elevado número de cópias, 10.000 por parasito^{26,35,36}.

O espaçador interno transcrito 1 (*its1*), localizado entre as subunidades 18S e 5,8 S do rRNA de leishmânia tem sido muito utilizado em PCR pelo fato de serem sensíveis e específicas para a detecção de DNA de leishmânia em pacientes com LT^{21,27,30,37,38}. Existem entre 40 e 200 cópias do *its1* em cada parasito. Além disso, a digestão do produto de PCR com as enzimas de restrição (PCR-*its1*-RFLP-*HaeIII*) permite a diferenciação de espécies de leishmânia³⁰.

A *hsp70* é uma proteína de choque térmico que pertence à família das chaperonas, auxiliando o enovelamento proteico e encaminhando a proteína à destruição, caso ela não consiga assumir a configuração terciária correta³⁹. Entre cinco e 10 cópias do gene que codifica a *hsp70* estão presentes no genoma do parasito⁴⁰, e pequenas diferenças na sequência nucleotídica podem existir entre as espécies⁴¹. Fraga et al.⁴² realizou estudo filogenético das espécies de leishmânia com base em variações encontradas na *hsp70*. Outros pesquisadores também empregaram esta proteína de 70 kilodaltons de discriminar espécies de leishmânia^{24, 27,28, 43-46}.

O gene *prp1* codifica uma proteína da família dos transportadores ABC (ATP-binding cassette), capaz de conferir resistência à pentamidina em *Leishmania major*. A análise da organização genômica de *prp1* em *L. major* mostrou se tratar de gene de cópia única que não apresenta ortólogos nos parasitos do gênero *Trypanosoma*, como *T. brucei* e *T. cruzi*⁴⁷. Como o gene *prp1* encontra-se conservado em outras espécies do gênero *Leishmania*, inclusive em *L. (V.) braziliensis*, acreditamos que esse transportador ABC possa ser específico do gênero *Leishmania* e por consequência importante para ser utilizado como potente marcador diagnóstico nas Leishmanioses^{31,32}.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Este trabalho teve como objetivo geral a avaliação de técnicas de PCR empregando os marcadores *kDNA*, *its1*, *hsp70* e *prp1* para o diagnóstico da LT em amostras de DNA extraídas de fragmentos de lesões de pele e de mucosa de pacientes do Instituto de Infectologia Emílio Ribas com suspeita de LT.

2.2 Objetivos específicos:

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Padronizar três técnicas de PCR com iniciadores de diferentes sequências e genes do parasito, para a detecção do gênero *Leishmania* e diferenciação de espécies relacionadas à LT no Brasil;
- Validar as técnicas de PCR, previamente padronizadas, com amostras de DNA de fragmentos de lesões de pele e mucosas de pacientes com e sem LT;
- Determinar e comparar os desempenhos das técnicas moleculares para o diagnóstico da LT.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Esta pesquisa recebeu a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, protocolo de pesquisa nº32/09 e do Comitê de Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (CEP-IMT 046/2009). O comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo tomou ciência do projeto em 11 de abril de 2012 (ANEXOS A, B e C).

3.2 Organismos de referência utilizados

Os parasitos das espécies de referência do gênero *Leishmania* relacionados à leishmaniose tegumentar humana (LT) foram identificados, selecionados e gentilmente cedidos pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Marta Teixeira e do Prof. Dr. Jeffrey Shaw, ambos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), e também provenientes da Coleção de leishmânias do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) (Tabela 3).

Outras espécies de tripanossomatídeos, também foram gentilmente cedidas pelos grupos de estudo do ICB-USP, e empregados nos testes de especificidade dos iniciadores das quatro técnicas de PCR em estudo.

As formas promastigotas de leishmânias e outros tripanossomatídeos foram cultivados *in vitro* (ver detalhes no tópico 3.5.2 e no Apêndice B) e a extração de DNA genômico dos parasitos foi realizada pelo método de fenol e clorofórmio (ver detalhes no tópico 3.5.4.1.1).

Amostras de DNA dos fungos *Fonsecaea pedrosoi*, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* foram gentilmente cedidas pela Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro, do Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina

Tropical de São Paulo. Estas amostras de DNA fúngico foram utilizadas para a realização de testes de especificidade dos iniciadores das quatro técnicas de PCR em estudo. Estes fungos são agentes etiológicos de micoses que apresentam manifestações clínicas semelhantes à LT. Os microrganismos utilizados estão listados na Tabela 3.

Tabela 3- Microrganismos utilizados neste estudo.

Categorias	Espécies	Código Internacional	Procedência
Agentes etiológicos da LT no Brasil	<i>L. (L.) amazonensis</i>	IFLA/BR/1967/PH8	ICB- USP
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903	ICB- USP
	<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1975/M4147	CLIOC-RJ
	<i>L. (V.) naiffi</i>	MDAS/BR/1979/M5533	ICB- USP
	<i>L. (V.) shawi</i>	MCEB/BR/1984/M8408	ICB- USP
	<i>L.(L.) lainsoni</i>	MHOM/BR/1981/M6426	ICB- USP
outras espécies de leishmânias	<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	MHOM/BR/1974/PP75	CLIOC-RJ
	<i>Leishmania tarentolae</i>		ICB- USP
Tripanossomatídeos	<i>Blastocrithidia</i>		IMT-SP
	<i>Crithidia acanthocephali</i>		ICB- USP
	<i>Crithidia fasciculata</i>		ICB- USP
	<i>Crithidia lucilae</i>		ICB- USP
	<i>Endotrypanum schaudinni</i>		ICB- USP
	<i>Leptomonas seymouri</i>		ICB- USP
	<i>Trypanossoma cruzi</i>		IMT-SP
Fungos	<i>Fonsecae pedrosoi</i>		Laboratório de Micologia
	<i>Histoplasma capsulatum</i>		Médica- IMT- SP
	<i>Paracocco brasiliensis</i>		

3.3 Triagem de pacientes.

Este estudo foi conduzido com pacientes atendidos no ambulatório do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, Brasil, entre março de 2007 e janeiro de 2013. O critério de triagem de pacientes foi: indivíduo adulto apresentando lesão ou lesões cutâneas ou mucocutâneas sugestivas de LT e procedente de área endêmica de leishmaniose.

3.3.1 Critérios de inclusão e exclusão de pacientes e suas amostras no grupo de estudo

Foram incluídos no estudo indivíduos adultos que apresentaram positividade em pelo menos um dos três testes laboratoriais (IDRM e/ou pesquisa direta e/ou *kDNA* PCR¹¹). Os pacientes que não foram submetidos a testes laboratoriais foram excluídos do estudo.

3.3.2 Controles negativos

Um segundo grupo (controle) foi composto por voluntários adultos saudáveis dos quais foram obtidas amostras de sangue periférico. Além destas amostras de sangue, foram incluídas biópsias de pele de pacientes que tiveram o diagnóstico de LT excluído.

3.3.3 Dados complementares dos pacientes

Dados complementares dos pacientes incluindo dados epidemiológicos, exames laboratoriais para a investigação de outras doenças que fazem parte do diagnóstico diferencial da LT, a conduta terapêutica adotada, resultados de exames histopatológicos e evolução da doença, foram coletados dos prontuários médicos disponibilizados pelo Instituto de Infectologia Emílio Ribas.

3.4 Coleta de fragmentos de lesões cutâneas ou mucosas

Os pacientes com suspeita clínica e epidemiológica de LT foram submetidos à biópsia de lesão ou lesões, preferencialmente na borda de lesões recentes, após assepsia com álcool 70% e anestesia local com lidocaína 1 ou 2%. O diâmetro do

“punch” a ser utilizado foi de 2 mm para lesões na face e de 4 a 5 mm para lesões em outras regiões do corpo.

Após a coleta, o fragmento de lesão foi processado para a realização de exames laboratoriais. Assim, o fragmento de lesão foi dividido em duas ou três partes, e cada parte foi destinada a: pesquisa direta, cultura *in vitro*, extração de DNA e exame histopatológico. As lâminas para pesquisa direta foram preparadas com a impressão do fragmento de lesão após lavagem do mesmo com solução salina estéril para retirada de excesso de sangue. Um dos fragmentos de lesão poderia ser encaminhado para os exames histopatológicos em recipiente com formol neutro a 10%. O fragmento destinado ao isolamento e cultivo *in vitro* e extração de DNA foi transportado ao laboratório em frasco estéril contendo solução salina com antibióticos e antifúngicos (descritos no tópico sobre isolamento e cultivo *in vitro* 3.5.2 e APÊNDICE A) a temperatura ambiente.

3.5 Exames laboratoriais para o diagnóstico de LT

A pesquisa direta do parasito, isolamento e cultivo *in vitro* do parasito e detecção do DNA do parasito por PCR foram realizados pela equipe do Prof. Dr. Paulo C. Cotrim, no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT- USP). Elaborou-se uma apostila com os protocolos operacionais padrão e fluxograma das atividades a serem realizadas desde a recepção da amostra no laboratório até a liberação dos laudos contendo os resultados dos testes (APÊNDICE C).

3.5.1 Microscopia

As lâminas preparadas no ambulatório foram recebidas no laboratório, fixadas com metanol e coradas com kit de coloração conforme protocolo descrito pelo fabricante (*Instant Prov kit* da *Newprov*, BR). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (ECLIPSE E200, *Nikon*, Tóquio, JP) em objetiva de imersão (aumento final de 1000x), a procura de formas amastigotas de leishmânias. O resultado foi considerado positivo quando formas amastigotas, típicas de leishmânias, eram encontradas; negativas quando as formas estavam ausentes e resultado sugestivo quando formas atípicas do parasito, com núcleo e cinetoplasto não definidos eram observadas.

3.5.2 Isolamento e cultivo *in vitro* de parasitos

Os fragmentos das lesões de pele foram transportados em até quatro horas para o laboratório, embebidas em solução salina com antibióticos e antifúngico: (100 U/mL de penicilina G sódica (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA®, St. Louis, EUA), 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) e 50 µg/mL de flucitosina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA), a temperatura ambiente. Em seguida, o fragmento foi dividido e a porção destinada ao isolamento e cultivo do parasito foi macerado, adicionado a frascos de cultura com meio bifásico NNN (Novy-Nicolle- McNeal) e meio 199 com sal de Hanks (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (Vitrocell, Campinas, BR), incubados a 26°C em incubadora climatizada (*biochemical oxygen demand- BOD*) (Eletrolab, São Paulo, BR). Durante um mês, observações microscópicas semanais foram realizadas a procura de formas promastigotas do parasito. A amostra foi considerada positiva quando as formas promastigotas do parasito eram encontradas e, negativas quando, após um mês, o parasito não era encontrado. As culturas positivas foram expandidas

em meio líquido 199 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (Vitrocell, Campinas, BR), e incubadas a 26°C em estufa BOD para posterior extração de DNA genômico e/ou congelamento em nitrogênio líquido. O mesmo procedimento foi realizado para as espécies de referência de leishmânias e os outros tripanossomatídeos (detalhes ver no APÊNDICE B).

3.5.3 IDRM

A IDRM foi realizada pelo Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP com o antígeno de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/PH8), distribuído pelo Ministério da Saúde do Brasil. Após 72h, a reação foi avaliada, medida e registrada em prontuário médico. Foram utilizados os critérios recomendados pelo Ministério da Saúde¹ para a interpretação dos resultados: positivo para enduração maior que 5 mm, e negativo para enduração ausente ou com diâmetro menor que 5 mm. Os resultados deste exame foram coletados dos registros médicos.

3.5.4 Testes moleculares

3.5.4.1 Extração de DNA genômico

3.5.4.1.1 Extração de DNA genômico de formas promastigotas de parasitos

A extração de DNA a partir de cultura de parasitos foi realizada pelo método fenol clorofórmio⁴⁸. Inicialmente, os parasitos isolados e cultivados de espécies de leishmânias de referência e de fragmentos de lesão de pacientes foram quantificados e a concentração foi ajustada para $1,0 \times 10^7$ parasitos/mL de meio de cultivo. A seguir, o volume de 1,0 mL de cada amostra de cultura de parasitos foi utilizado para a extração de DNA (Apêndice C).

3.5.4.1.2 Extração de DNA genômico de fragmentos de lesão de pacientes

A extração de DNA genômico de fragmentos de lesão provenientes de pacientes com suspeita de LT foi realizada com kit de extração Wizard® Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA) seguindo o protocolo específico para extração de DNA de tecidos, recomendado pelo fabricante (Apêndice C).

3.5.4.1.3 Extração de DNA genômico a partir de amostras de sangue

A extração de DNA a partir de amostras de sangue (grupo controle) foi realizada com kit de extração QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN®, Hilden, Alemanha) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante²⁸ (Apêndice C)

3.5.4.2 Quantificação e controle de qualidade do DNA extraído

As amostras de DNA extraídas foram quantificadas mediante uso de espectrofotômetro (Nanodrop 2000c, Thermo, USA) medindo-se a absorbância a 260 nm. O valor da razão de absorbância $OD_{260} : OD_{280}$ foi utilizado como indicador do grau de contaminação das amostras de DNA por proteínas. A contaminação com solventes (fenol) foi avaliada a 320 nm. Neste estudo utilizamos apenas as amostras cuja razão $OD_{260} : OD_{280}$ foi entre 1,8 e 2,0.

3.5.4.3 Amplificação inespecífica de DNA genômico total (REPLI-g mini kit – QIAGEN)

As reações foram realizadas de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (QIAGEN®, Hilden, Alemanha). Resumidamente, volumes de 5 μ L

contendo 20 ng de DNA das amostras foram adicionados aos tampões D1 (9 µL tampão DLB, 32 µL água livre de nucleases) e N1 (12 µL de tampão contendo solução para interrupção da reação, 68 µL água livre de nucleases) e o mix de reação: 29 µL de REPLI-g tampão de reação, 1 µL REPLI-g DNA polimerase (volume para 7 reações, preparado e deixado em repouso, em gelo).

Com os tampões D1 e N1 prontos, além do mix de reação, ou 5 µL de DNA foram colocados em um microtubo de 0,2 ml, ao qual foram adicionados 5 µL do tampão D1 (mesmo volume do DNA), a solução foi homogeneizada em *vortex*, e deixada em repouso em temperatura ambiente por 3 minutos. A seguir, foram acrescentados 5 µL do tampão N1 (mesmo volume do DNA), a solução foi novamente homogeneizada em *vortex*, e deixada em repouso em temperatura ambiente por 3 minutos. Finalmente, 20 µL do mix de reação foram adicionados ao volume final de reação que foi de 50 µL. Esta solução foi incubada à 30°C por 14 horas, e a seguir armazenada em freezer em temperatura de -20°C até o momento do uso.

3.5.4.4 Testes de detecção, especificidade e identificação das espécies de leishmânias.

3.5.4.4.1 Oligonucleotídeos

As sequências dos oligonucleotídeos utilizados como iniciadores, referências bibliográficas e ensaios em que foram utilizados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4- Oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação (PCR) neste estudo.

Oligonucleotídeo	Sequência 5' → 3'	PCR alvo	Referência
H β G-R	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	β -globina	Bialek et al. ⁴⁹
H β G-F	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC		
<i>kDNA</i> 20	GGGKAGGGGCGTTCTSCGAA	<i>KDNA</i>	Volpini et al. ²⁵
<i>kDNA</i> 22	SSSWCTATWTTACACCAACCCC		
LITSR	CTGGATCATTTCGGATG	<i>its1</i>	Schönian et al. ³⁰
L5.8S	TGATACCACTTATCGCACTT		
<i>Hsp70</i> R	GGACGAGATCGAGCGCATGGT	<i>hsp70</i>	Da Graça et al. 2012
<i>Hsp70</i> F	TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG		
<i>prp1</i> F	GCGGAATTCCYGGMGSRMRGYTGACRG TKGTG	<i>prp1</i>	Coelho et al. ³¹
<i>prp1</i> R	GCGGTGACMGTSGCYAGCACGCGCGTC TTGCC		

3.5.4.5 Reações em cadeia da polimerase (PCR)

3.5.4.5.1 PCR beta- globina humana

Inicialmente, todas as amostras de DNA de lesão de pele, mucosa ou sangue incluídas no estudo foram submetidas à amplificação por PCR com iniciadores dirigidos à beta-globina humana para verificar a qualidade e integridade do DNA extraído e garantir a ausência de inibidores de amplificação nas amostras, seguindo protocolo previamente descrito⁴⁹, que está resumido na Tabela 5 (detalhes no Apêndice C).

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), em gel de agarose a 2,0%, a 80 Volts por 40 min., sendo posteriormente corados em solução com brometo de etídio a 5 μ g/mL (LKB-Producter AB®, Bromma, Suécia). Os produtos de amplificação foram visualizados em transiluminador (UVP, Ultra-Violet products, Cambridge, UK) e fotografados. Utilizamos o marcador de peso molecular 100 bp *Gene Ruler* (Fermentas®, Ontário,

Canadá). A amostra foi considerada positiva quando um fragmento de 268 pares de bases (pb) foi visualizado.

3.5.4.5.2 Testes de padronização (limiar de detecção e testes de especificidade)

A padronização das quatro PCR com os iniciadores em estudo para a detecção de DNA de leishmânia foi realizada com amostras de DNA extraídas de culturas de promastigotas de espécies de referência de leishmânias, DNA de fungos e DNA de tripanossomatídeos listados na tabela 3 (testes de especificidade). Em cada experimento foram incluídos: um controle negativo constituído por água ultrapura estéril em substituição à amostra de DNA. Os protocolos de PCR utilizados nas respectivas reações de amplificação para cada par de iniciadores (*kDNA*, *its1*, *hsp70* e *prp1*) foram descritos nos próximos tópicos e estão resumidos na tabela 5.

O limiar de detecção (sensibilidade analítica) das quatro PCR (*kDNA*, *its1*, *hsp70* e *prp1*) para a detecção do DNA do parasito foi determinado utilizando diferentes concentrações de DNA de parasitos em volume final de reação de 50 µL, a saber: 200 ng, 100 ng, 50 ng, 5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 500 fg, 50 fg e 5 fg, 500 ag, 50 ag e 5 ag. As reações foram realizadas na presença e na ausência de 50 ng de DNA genômico humano de indivíduo sadio (“*spiked samples*”).

3.5.4.5.3 PCR- *kDNA*-RFLP-*HaeIII*

Este ensaio foi baseado na técnica descrita por Volpini e colaboradores²⁵ que utilizou iniciadores para a amplificação de fragmento de 120 pb pertencente a uma região conservada do DNA de mini-círculos do cinetoplasto de leishmânia (*kDNA*). As sequências de nucleotídeos dos iniciadores denominados *kDNA* 20 e *kDNA* 22

estão descritas na tabela 4 e as condições de amplificação estão resumidas na tabela 5 (o procedimento detalhado está descrito no Apêndice C).

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal conforme descrito para a reação para os genes da betaglobina humana (item 3.5.4.4.1). A amostra foi considerada positiva quando um fragmento de 120 pb foi visualizado.

A análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction fragment length polymorphism*- RFLP) foi realizada seguindo o protocolo descrito por Volpini e colaboradores²⁵ (Apêndice C). Neste experimento, 10 µL de produto de amplificação positivo para *kDNA*-PCR (contendo o fragmento de 120 pb) foram digeridos com 10 U da enzima de restrição *HaeIII* (Fermentas®, Ontário, Canadá), contendo tampão 1x e água bidestilada estéril para um volume total de reação de 15 µL, sempre seguindo as orientações do fabricante. As amostras foram incubadas a 37°C por 3 horas.

Os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese vertical (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) em gel de poliacrilamida a 10% e Tampão TAE 1x. Posteriormente, os géis foram corados em brometo de etídio a 0,5 µg/mL (LKB-Producter AB®, Bromma, Suécia). Os resultados foram visualizados em transiluminador (UVP, Ultra-Violet products, Cambridge, UK) e fotografados. Utilizamos como marcador de peso molecular o *Ultra low range ladder* (Fermentas®, Ontário, Canadá). Em cada gel, amostras de DNA amplificadas e digeridas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foram adicionadas para comparar o padrão eletroforético dos produtos da digestão das amostras. A amostra foi considerada como pertencente à espécie *L. (V.) braziliensis* quando observávamos a presença de digestão do fragmento amplificado de 120 pb, originando dois fragmentos: um de 80 pb e outro de 40 pb.

3.5.4.5.4 PCR- *its1*- RFLP-*HaeIII*

A reação de amplificação da região dos espaçadores internos dos transcritos do rDNA (*its1*) baseou-se no protocolo descrito por Schönian e colaboradores³⁰. Esta técnica permite a identificação de espécies de leishmânias após digestão enzimática dos produtos de amplificação desta PCR. As sequências de nucleotídeos dos iniciadores utilizados estão descritas na tabela 4, e as condições de amplificação e concentrações de reagentes estão descritas na tabela 5 e no Apêndice C.

Os resultados da PCR foram visualizados após eletroforese horizontal em gel de agarose 2%, conforme descrito anteriormente.

O produto de amplificação esperado para as espécies de leishmânia variou entre 300 - 350 pb dependendo da espécie (ver seção de Resultados, tópico 4.4.3).

Para a identificação das espécies de leishmânia por RFLP³⁰, as amostras positivas nesta amplificação foram digeridas enzimaticamente com *HaeIII*, conforme descrito na reação RFLP-*HaeIII* em amplificadas de PCR-*kDNA*.

Os produtos de digestão enzimática foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 10%, conforme relatado para PCR *kDNA*- RFLP- *HaeIII* (item anterior).

Os padrões eletroforéticos obtidos nas amostras de DNA extraídas de pacientes foram comparados com os padrões observados nos experimentos com amostras de DNA das espécies de leishmânias de referência e ao descrito em trabalho de Schönian et. al.³⁰.

As amostras de DNA extraídas de lesões que foram negativas no *its1*-PCR foram reamplificadas, utilizando-se 2,0 µL do produto de amplificação da primeira PCR em substituição ao DNA da amostra original. As amostras positivas após a segunda amplificação foram submetidas à mesma digestão enzimática descrita acima para a identificação da espécie do parasito infectante.

3.5.4.5.5 PCR- *hsp70*- RFLP- *HaeIII* *BstUI*

A reação de amplificação do gene *hsp70* ('heat shock protein' 70) foi baseada no protocolo original descrito por Garcia e colaboradores²², modificado por Graça e colaboradores²⁷. Neste artigo, vários pares de iniciadores para este gene-alvo foram testados a fim de verificar a sensibilidade e potencial para a identificação das espécies de leishmânias. Em nosso estudo, escolhemos o par de iniciadores denominado *hsp70c* devido descrita elevada sensibilidade destes iniciadores e por possibilitarem a diferenciação das espécies de leishmânias pertencentes ao subgênero *Viannia* após a RFLP com as enzimas de restrição *HaeIII* e *BstUI*. As sequências de nucleotídeos dos iniciadores utilizados estão descritas na tabela 4 e as condições de PCR estão resumidas na tabela 5.

Os resultados da PCR *hsp70* foram visualizados em gel de agarose á 2% após eletroforese horizontal, como descrito anteriormente.

As amostras positivas contendo produto de amplificação de 234 pb, foram selecionadas e submetidas à digestão enzimática com *HaeIII* e *BstUI* (Fermentas®, Ontário, Canadá) visando a identificação das espécies de leishmânias infectantes pela análise dos fragmentos gerados²⁵. Para cada amostra positiva para PCR- *hsp70*, foram preparados dois microtubos com 10 µL de produto de amplificação e 5 µL de uma das soluções: 10 U de *HaeIII* (Fermentas®, Ontário, Canadá), tampão 1x e água bi-destilada estéril ou com 10 U de *BstUI* (Fermentas®, Ontário, Canadá), tampão 1x e água bidestilada estéril. As amostras foram homogenizadas e incubadas a 37°C por 3 horas.

Os fragmentos de restrição, produzidos após digestão com as enzimas *HaeIII* e *BstUI* foram separados por eletroforese vertical (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) em gel de poliacrilamida a 10%, conforme descrito para as outras reações de RFLP.

A identificação da espécie de leishmânia infectante das amostras baseou-se na combinação dos padrões eletroforéticos obtidos nos produtos de RFLP- *HaeIII* e RFLP- *BstUI* e comparados com a combinação dos padrões eletroforéticos obtidos em ensaios com DNA das espécies de leishmânias de referência. Os perfis eletroforéticos resultantes de cada reação de RFLP para cada espécie de leishmânia estão descritas nos resultados (tópico 4.4.4.3).

3.5.4.5.6 PCR-*prp1*

A reação de amplificação de fragmento por PCR com iniciadores voltados para do gene de resistência *prp1* que codifica uma Glicoproteína P de membrana relacionada com a resistência à pentamidina e denominada PRP1, seguiu protocolo descrito por Coelho e colaboradores³¹. Neste estudo, foi observada uma pequena diferença nos padrões eletroforéticos obtidos após amplificação do DNA das espécies *Leishmania (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi*. O produto de amplificação esperado apresenta 2 fragmentos dependendo da espécie analisada. Um de aproximadamente 600 pb, presente na amplificação dos DNA de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e ausente em *L. (L.) infantum chagasi* (sendo que o fragmento amplificado em *L. (V.) braziliensis* é maior em 18 nucleotídeos). O segundo fragmento de cerca de 500 pb presente nas 4 espécies analisadas foi sequenciado e correspondia a uma outra proteína da família das Glicoproteínas P de membrana diferente da PRP1³¹. As sequências de nucleotídeos dos iniciadores utilizados estão descritas na tabela 4 e as condições da PCR estão descritas na tabela 5.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal, conforme descrito anteriormente.

As amostras de DNA extraídas de lesão negativas para *prp1*-PCR foram reamplificadas, utilizando-se 2,0 µL de produto de amplificação substituindo a amostra de DNA.

Tabela 5- Protocolos de PCR para detecção e identificação das espécies de leishmânias utilizadas neste estudo.

REAÇÃO	INICIADOR	Beta globina	kDNA	ITS1	hsp70	PRP1
MIX	Tampão Taq pol.	1x	1 x	1 x	1x	1x
	MgCl ₂	1.5 mM	1.0 mM	1.5 mM	1.0 mM	1.0 mM
	dNTPmix	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM
	Primer R	500 nM	375 nM	500 nM	500 nM	500 nM
	Primer F	500 nM	375 nM	500 nM	500 nM	500 nM
	Taq polimerase*	2.0 U	2.5 U	2.0 U	1.5 U	2.5 U
	DNA	150 ng	50 ng	50 ng	200 ng	200 ng
*para cada 50 µL de reação						
PCR	Desnaturação inicial	95 °C- 2 min.	94 °C- 4 min.	95 °C- 2 min.	94 °C- 5 min.	94 °C- 3 min.
	número de ciclos	35	35	35	30	40
		Den.- 95 °C – 20 s	Den.- 94 °C – 1 min.	Den.- 95 °C – 20 s	Den.- 94 °C – 30 s.	Den.- 94 °C – 1 min.
	Amplificação	An.- 53°C- 30s	An.- 58 °C- 1 min.	An.- 53°C- 30s	An.- 63 °C- 1 min.	An.- 55 °C- 1 min.
		Pol. 72°C – 1 min.	Pol. 72°C – 30 s	Pol. 72°C – 1 min.	Pol. 72°C – 1 min.	Pol. 72°C – 2 min.
	Extensão final	72 °C- 6 min.	72 °C- 5 min.	72 °C- 6 min.	72 °C- 10 min.	72 °C- 7 min.
ELETROFORESE	Gel de agarose	2,00%				
	Tampão de corrida	TAE 1X				
	Condições	80 Volts por 40 minutos				
	Tamanho do produto de amplificação	268 pb	125 pb	300 - 350 pb	234 pb	500 e 600 pb
DIGESTÃO ENZIMÁTICA	Enzima de restrição	Não se aplica	HaeIII	HaeIII	HaeIII e BstUI	Não se aplica
	Quantidade de enzima		10 U	10 U	10 U	
	Tampão de enzima		1 x	1 x	1 x	
	Amplicons		10 uL	10 uL	10 uL	
	Volume final		15 uL	15 uL	15 uL	
	Incubação		3 h a 37 °C	3 h a 37 °C	3 h a 37 °C	
ELETROFORESE	Gel de poliácridamida	10%, TAE 1X, 80V, 2h				
	Tampão					

3.6 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando os programas Sigma Stat versão 3.5 e Prisma versão 5.0. Os níveis de significância dos testes foram fixados aceitando um erro tipo 1 de 5% ($\alpha = 0,05$).

A comparação entre proporções (positividade) foi realizada empregando o teste exato de Fisher, qui-quadrado (χ^2) com correção de Yates, conforme o indicado. A comparação entre os resultados obtidos pelos testes moleculares para verificar a existência de concordância ou discordância foi determinada pelo teste de McNemar.

Para a análise de desempenho dos testes foram calculados os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, “likelihood ratio” ou razão de verossimilhança e eficiência⁵⁰

4 RESULTADOS

4.1 Grupo de estudo e controle

Um total de 272 pacientes atendidos no ambulatório do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, provenientes de áreas endêmicas de LT com lesão ou lesões cutâneas e/ou mucocutâneas típicas da doença foram triados para coleta de biópsia para realizar os exames laboratoriais para diagnóstico de LT.

Após pesquisa de dados dos prontuários médicos e análise dos resultados da pesquisa direta, IDRM e *kDNA*-PCR, excluímos os pacientes que não atendiam os critérios de inclusão e formamos o grupo de estudo com 140 pacientes (APÊNDICE E).

O grupo controle foi constituído por 102 amostras: 15 amostras de DNA de pacientes que apresentaram resultados negativos para pesquisas direta, IDRM, *kDNA*-PCR e 87 amostras de DNA extraídos de sangue de voluntários que apresentaram resultados negativos para *kDNA*-PCR e positivos para PCR para beta globina humana.

Os dados coletados dos prontuários médicos indicam que do total de 140 pacientes incluídos no estudo, a maioria dos pacientes era do sexo masculino (89/140 – 63,6%) enquanto 36,4% (51/140) eram do sexo feminino. De 125 pacientes, a mediana de idade foi de 49 anos (mín. 6 – máx. 90). Oitenta e um (81/140- 57,8%) pacientes apresentaram lesão ou lesões cutâneas e 59 apresentaram lesão em mucosa (59/140- 42,2%). A maioria dos pacientes eram procedentes das regiões: Nordeste (MA, BA, PE, PI, RN, PB, CE), e Sudeste (MG, SP, RJ), com 50 e 47 casos respectivamente. Os demais pacientes eram procedentes da região Norte (6 casos), Centro-Oeste (6 casos) e Sul (5 casos). Quatro pacientes eram procedentes de outros países da América Latina. O local provável de infecção não foi registrado para 22 pacientes (Figura 1).

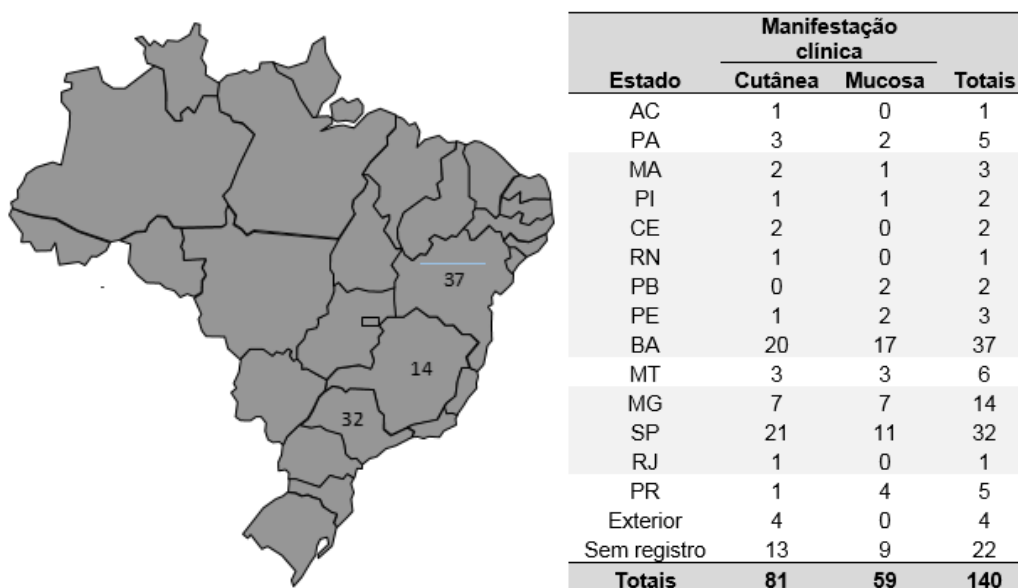


Figura 1- Distribuição geográfica dos pacientes com LT do grupo de estudo.

4.2 Exames laboratoriais de rotina- microscopia e IDRM

Os registros dos exames laboratoriais indicam que foram recebidas lâminas com aposição de lesão de 59,3% pacientes do grupo de estudo (83/140) para realização do diagnóstico por pesquisa direta do parasito. O parasito foi visualizado em 68,7% (57/83) das lâminas, em 21,7% (18/83) o resultado foi inconclusivo e em 9,6% (8/83) o exame foi considerado negativo.

A IDRM foi realizada em 65,7% (92/140) dos pacientes e foram observados os seguintes resultados: 69,6% (64/92) foram positivos (enduração > 5,0 mm) e em 30,4% (28/92) dos casos o teste foi não reagente.

Trinta e sete pacientes apresentaram resultados inconclusivos para pesquisa direta e IDRM. Nestes casos, a suspeita de LT foi confirmada por PCR-*kDNA*.

4.3 Isolamento e cultivo *in vitro* de de parasitos

Embora este procedimento não seja realizado de forma rotineira para diagnóstico de LT, nós coletamos material biológico de 90,7% dos pacientes do grupo de estudo (127/140). Verificamos que a técnica foi positiva em 27,6% (35/127) das amostras, contaminou em 32,3% (41/127) e foi negativa para 40,1% (51/127).

4.4 Padronização dos protocolos de PCR

4.4.1 Limiar de detecção

Os ensaios para determinação do limiar de detecção das quatro PCR utilizando os iniciadores em estudo (Tabela 4) foram realizados somente com DNA de cepa de referência de *L. (V.) braziliensis* e, posteriormente com a adição de DNA genômico humano (“spiked samples”).

Nas figuras 2 A e B mostram os resultados dos ensaios realizados com oligonucleotídeos para a detecção do DNA de cinetoplasto (*kDNA*), 2 A com DNA do parasito e 2B com DNA do parasito e DNA humano.

Nesta PCR, o DNA do parasito foi detectado até o limite de 500 fg, em presença ou não de DNA humano. Houve formação de dímeros de iniciadores no ensaio sem amostra de DNA humano, constatados como um fragmento de baixo peso molecular (inferior ao fragmento alvo da amplificação de 120 pb), o que dificultou a interpretação dos resultados.

Nos ensaios com os iniciadores para o alvo *its1*, o DNA de parasito foi detectado até o limite de 5 pg de DNA genômico em amostras com e sem DNA humano (Figuras 3 A e B). No ensaio com amostra de DNA do parasito e DNA humano, foi possível detectar o DNA do parasito até 500 fg. Embora os iniciadores dirigidos para o *kDNA* sejam capazes de detectar o DNA do parasito em menor

quantidade na amostra (500 fg), os experimentos com *its1* não apresentaram formação de dímeros, o que facilitou a interpretação dos resultados.

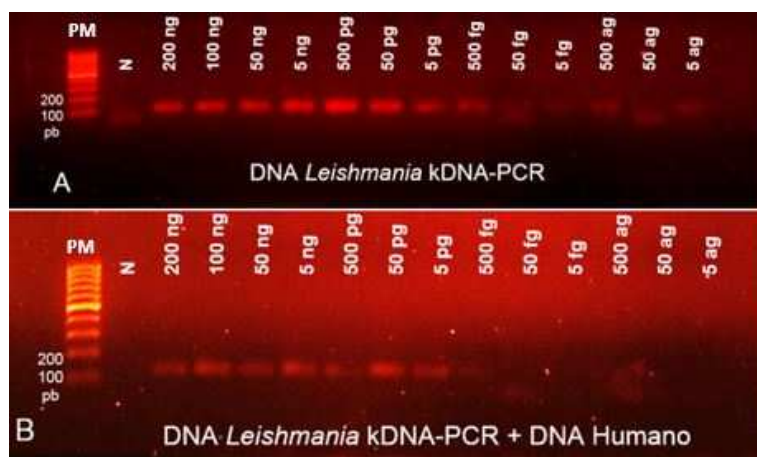


Figura 2- Limiar de detecção (sensibilidade analítica) da PCR *kDNA*. Eletroforese em gel de agarose mostrando os produtos de amplificação do *kDNA* com DNA de *L. (V.) braziliensis*. Concentrações de DNA: 200 ng a 5 ag. Experimentos (A) sem e (B) com a adição de 50 ng de DNA humano. (PM): Marcador de peso molecular, (N): Controle Negativo.

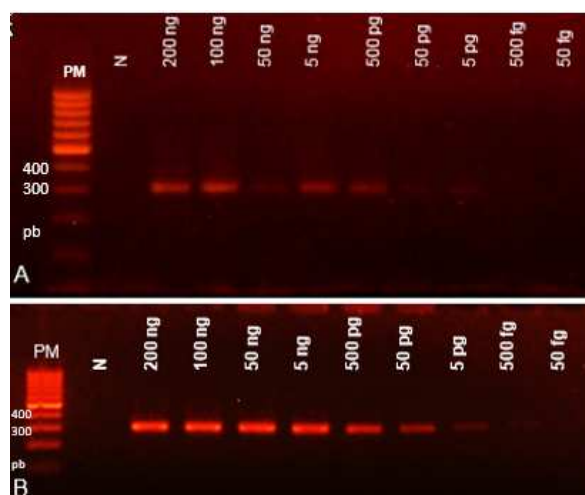


Figura 3- Limiar de detecção (sensibilidade analítica) da PCR-*its1*. Eletroforese em gel de agarose com produtos de amplificação da PCR-*its1* com DNA de *L. (V.) braziliensis*. Concentrações de DNA: 200 ng a 50 fg. Experimentos (A) sem e (B) com a adição de 50 ng de DNA humano. (PM): Marcador de peso molecular, (N): Controle Negativo.

Por outro lado, quando realizamos a amplificação nas mesmas condições anteriores, utilizando iniciadores dirigidos para *hsp70* não observamos a amplificação

de DNA do parasito em concentrações inferiores a 200 ng por amostra, mesmo após repetir os experimentos diversas vezes. No entanto, em experimentos anteriores, foi possível obter amplificação de fragmentos de 234 pb para as cepas referência de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Desta forma, consideramos que estes iniciadores foram capazes de detectar DNA do parasito de 4 ng até 40 pg para *L. (L.) amazonensis* (Figura 4 A) e de 200 ng até 400 fg para cepa de *L. (V.) braziliensis* (Figura 4 B) reação com volume total de 50 µL.

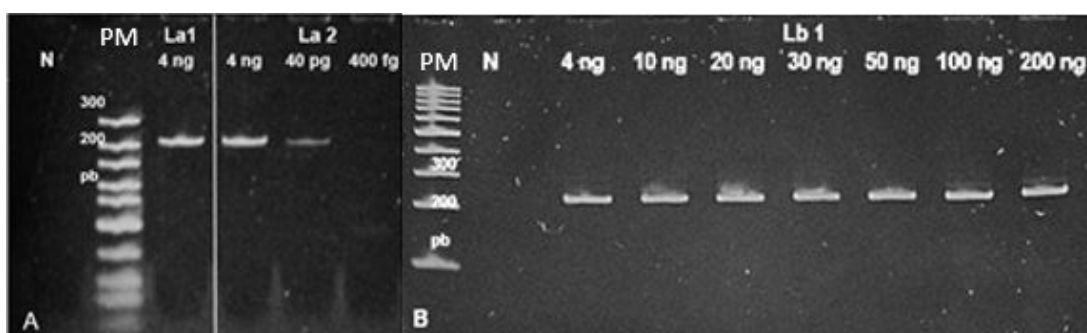


Figura 4- Limiar de detecção (sensibilidade analítica) por PCR utilizando iniciadores para *hsp70*. Eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos de amplificação do DNA de cepas de *L. (L.) amazonensis* (**La1**, **La 2**) e *L. (V.) braziliensis* (**Lb1**), nas concentrações de DNA indicadas. **N**- Controle negativo. **(PM)** Marcadores de peso molecular: **A**- Ultra low range ladder (Fermentas®); **B**- 100 bp Gene Ruler (Fermentas®).

Os ensaios de detecção para PCR utilizando iniciadores dirigidos para o *prp1* foram capazes de detectar o DNA de leishmânia nas concentrações superiores a 5 ng na presença ou não de 50 ng de DNA Humano (Figuras 5 A e B). Podemos visualizar que para *L. (V.) braziliensis* houve amplificação dos dois fragmentos esperados (de aproximadamente 500 pb e 600 pb), apenas nas concentrações de 50 ng e 5 ng na presença de DNA humano, e nas concentrações de 100 e 200 ng nos experimentos somente com DNA do parasito. Na figura 5B, na concentração de 5 ng nota-se a amplificação predominante do fragmento maior de aproximadamente 600 ng.

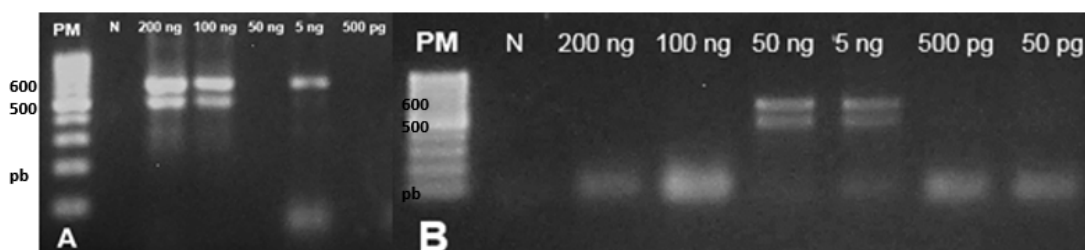


Figura 5- Limiar de detecção (sensibilidade analítica) da PCR utilizando iniciadores para *prp1*. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR-*prp1* de DNA de *L. (V.) braziliensis* em diferentes concentrações: 200 ng a 50 pg; **(A)** sem DNA humano e **(B)** com 50 ng de DNA humano. **(PM)** Marcador de peso molecular.

Os resultados destes ensaios de sensibilidade mostraram que os iniciadores para o gene *kDNA* foram capazes de detectar DNA extraído de cultura de promastigota de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em menor concentração (a partir de 500 fg) (Figuras 2 A e B) em PCR com volume final de 50 μ L. Os outros iniciadores, em ordem de concentração de DNA do parasito detectável foram: *its1* (a partir de 5 pg) (Figuras 3 A e B); *hsp70* (a partir de 40 pg) (Figuras 4 A e B), e *prp1* (o menos sensível) capaz de amplificar o fragmento esperado apenas a partir de 5 ng (Figuras 5 A e B). Houve diferença entre os ensaios na presença ou não de DNA genômico humano apenas nos experimentos onde utilizamos os iniciadores para *kDNA* e *prp1*; com formação de dímeros (Figura 2 B), ou apresentando diferentes produtos de amplificação, como por exemplo na figura 5 B (amostra com 5 ng de DNA do parasito), onde ocorreu amplificação preponderante do fragmento de cerca de 600 pb que provavelmente corresponde à amplificação do gene *prp1* em *L. (V.) braziliensis*.

A tabela 6 resume as quantidades mínimas de DNA de *L. (V.) braziliensis* detectadas em cada ensaio com os diferentes iniciadores, sem e com presença de DNA humano.

Tabela 6- Resultados dos ensaios de detecção de DNA de *L. (V) braziliensis* por PCR com diferentes iniciadores em reação com volume total de 50 µL.

PCR	DNA de <i>L. (V) braziliensis</i> .	DNA de <i>L. (V) braziliensis</i> . + 50 ng DNA humano
<i>kDNA</i>	500 fg	500 fg
<i>its1</i>	5 pg	500 fg
<i>hsp70</i>	40 pg	Sem amplificação
<i>prp1</i>	5 ng	5 ng

4.4.2 Especificidade dos iniciadores

Os testes para verificar a especificidade dos iniciadores em estudo foram realizados com DNA extraído de cultura de cepas de tripanossomatídeos inferiores e de fungos relacionados com micoses clinicamente semelhantes a LT.

A PCR com os iniciadores do *kDNA* apresentou reação cruzada (amplificação do mesmo fragmento de 120 pb) com todas as espécies de tripanossomatídeos testadas, mas não houve amplificação com o DNA dos fungos incluídos nos testes de especificidade (Figura 6 A).

A figura 6 B mostra os resultados obtidos para a amplificação com os iniciadores para *its1*, podemos observar que houve amplificação de fragmentos de DNA em de tripanossomatídeos. No entanto, os fragmentos amplificados nestes microrganismos apresentaram peso molecular distinto do apresentado em DNA de amostras de *Leishmania*: tripanossomatídeos apresentaram fragmentos com peso molecular com cerca de 500 pb, fragmentos maiores do que os apresentados pelas espécies de *Leishmania*. A exceção foi o DNA de *Trypanossoma cruzi* que apresentou fragmento com tamanho semelhante ao observado nas *Leishmanias*.

No ensaio realizado com o iniciador para o gene *hsp70*, a PCR foi positiva para todas as amostras de tripanossomatídeos. Os produtos de amplificação destes

microrganismos apresentaram o mesmo tamanho molecular dos produtos de amplificação de amostras de *Leishmania*: 234 pb (Figura 6 C).

No ensaio realizado com o iniciador *prp1* representado na figura 6 D, pode-se observar que não houve amplificação nos microrganismos: *T. cruzi*, *H. capsulatum*, *F. pedrosoi* e *P. braziliensis*. Nas outras amostras pode-se observar que houve a amplificação de vários fragmentos de DNA, mas todos apresentam amplificação de um fragmento de 500 pb. As espécies de tripanossomatídeos apresentaram padrão eletroforético com o fragmento de 500 pb em evidência, assim como o visto em *L. (L.) infantum chagasi* e *L. tarentolae*. Estas espécies não apresentaram amplificação do fragmento de 600 pb observados nas espécies associadas a doença cutânea. Observamos ainda nesta figura que as espécies de *Leishmania* associadas a LT apresentaram dois padrões eletroforéticos distintos: 1) *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (L.) amazonensis* apresentaram dois fragmentos: 500 pb e 600 pb; 2) *L. (V.) shawi*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* apresentaram três fragmentos: 500 pb, 600 pb e ~700 pb. Ainda observamos que a *L. (L.) infantum chagasi* apresentou apenas um fragmento de 500 pb. Esses resultados indicam que este marcador pode ser utilizado para distinguir as espécies de leishmânias.

4.4.3 Diagnóstico de LT por PCR para *its1*, *hsp70* e *prp1*

A PCR-*kDNA* detectou DNA em todas as amostras do grupo de estudo (140 amostras) e foi utilizado como critério de inclusão das amostras e, por isso seus resultados não foram incluídos nas análises.

Amostras de DNA do grupo de estudo foram submetidas as reações de amplificação com três iniciadores *its1*, *hsp70*, *prp1*.

Em ensaio realizado com amostras de DNA de pacientes não houve amplificação do DNA pela PCR-*prp1*. Repetimos o ensaio com diferentes

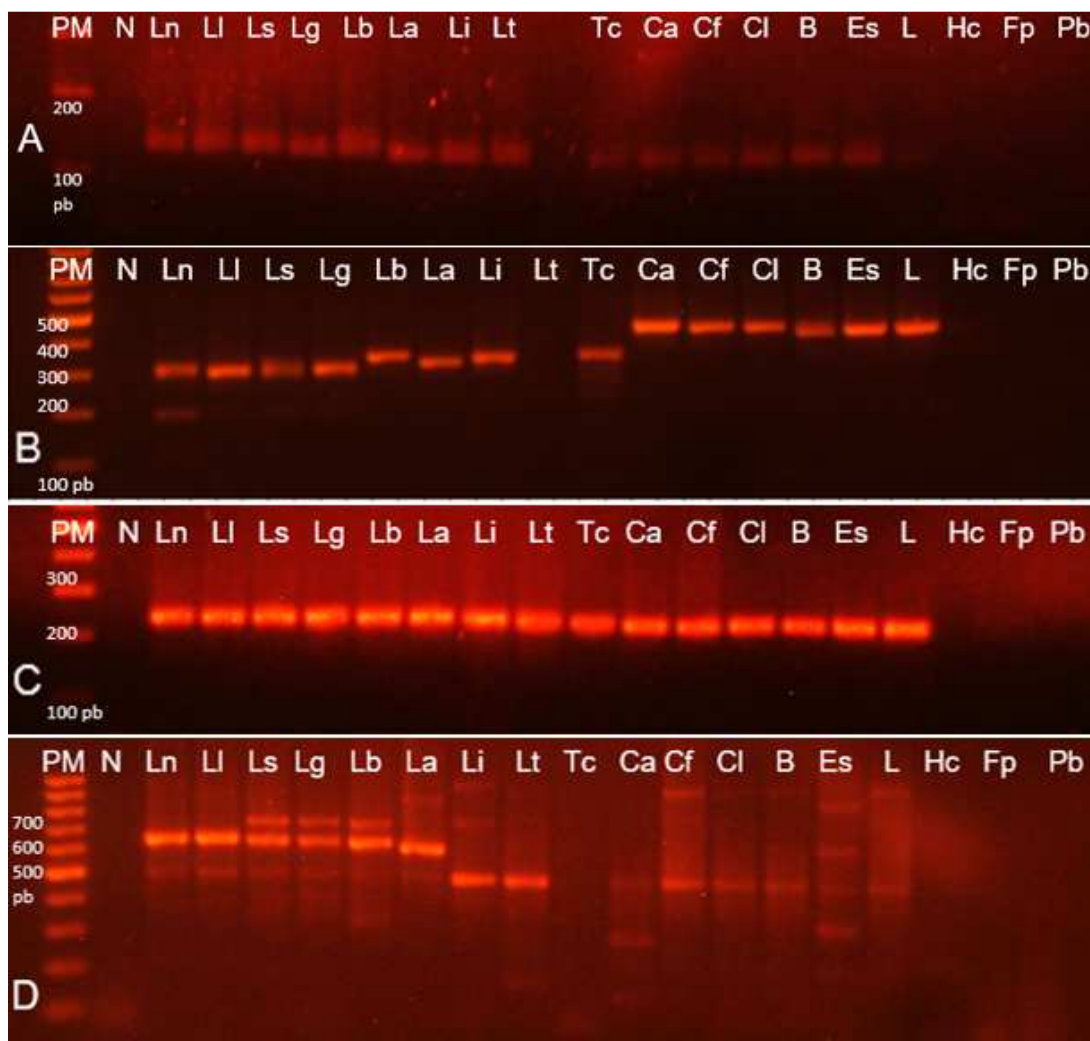


Figura 6- Ensaio de especificidade com dos iniciadores *kDNA* (A); *its1* (B); *hsp70* (C); *prp1* (D). Eletroforese em gel de agarose. Marcador de Peso molecular (PM). N- Controle negativo, Ln- *L. (V.) naiffi*; Li- *L. (V.) lainsoni*; Ls- *L. (V.) shawi*; Lg- *L. (V.) guyanensis*; Lb- *L. (V.) braziliensis*; La- *L. (L.) amazonensis* Li: *Leishmania (L.) infantum chagasi*; Lt: *Leishmania tarentolae*; Tc- *Trypanosoma cruzi*; Ca- *Crithidia acanthocephali*; Cf: *Crithidia faciculata*; Cl - *Crithidia lucilae*; B- *Blastocrithidia* sp.; Es- *Endotrypanum schaudinni*; L- *Leptomonas* sp.; Hc- *Histoplasma capsulatum*; Fp- *Fonsecaea pedrosoi*; Pb- *Paracoccidioides brasiliensis*.

quantidades de DNA de pacientes com LT e não obtivemos sucesso na detecção do parasito. Desta forma, cessamos os ensaios com o par de iniciadores para o *prp1* para poupar material biológico do grupo de estudo.

Na Tabela 7 apresentamos os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, “Likelihood ratio” positivo e negativo e eficiência dos três testes moleculares estudados.

Tabela 7- Desempenho dos testes moleculares para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar.

Testes moleculares	S	E	VPP	VPN	LRP	LRN	Ef
PCR- <i>its1</i>	57,1 (80/140)	100 (102/102)	100	63,0	∞	0,43	75,2
Re-amplificação PCR <i>its1</i>	85,7 (120/140)	100 (102/102)	100	83,6	∞	0,14	91,7
PCR- <i>hsp70</i>	68,4 (89/130)	100 (102/102)	100	71,3	∞	0,32	82,3

S – Sensibilidade; E – especificidade; VPP – valor preditivo positivo; VPN – valor preditivo negativo; LRP – “likelihood ratio” positivo; LRN – “likelihood ratio” negativo; Ef – eficiência; ∞ - infinito.

A PCR para o alvo *its1* foi positiva em 80 de 140 pacientes com leishmaniose tegumentar, resultando em uma sensibilidade de 57,1%. Observamos 42,8% (60/140) de resultados falsos negativos. Após a reamplificação do *its1* houve um acréscimo na sensibilidade de 28,5%, ou seja, 40 pacientes que inicialmente apresentaram resultado negativo após reamplificação do alvo apresentaram resultado positivo (Apêndice D).

A PCR para o alvo *hsp70* realizada após amplificação inespecífica do DNA das amostras com o kit Repli-G foi positiva em 89 de 130 pacientes com leishmaniose tegumentar, sensibilidade de 68,4%. Observamos 31,5% (41/130) de resultados falsos negativos (Apêndice D).

Considerando os dados apresentados na Tabela 7, o teste *its1* após reamplificação foi o que apresentou os melhores parâmetros para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar. A sensibilidade foi de 85,7%, especificidade de 100%,

valor preditivo positivo foi de 100% e negativo de 83,6%. Os valores de “Likelihood ratio” positivo e negativo obtidos foram infinitos e 0,14, respectivamente, a eficiência do teste foi de 91,7%.

A comparação dos resultados obtidos nos dois testes moleculares *its1* reamplificação e *hsp70* são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8- Comparação entre os resultados do PCR-*its1* reamplificação e *hsp70* em 130 indivíduos com leishmaniose tegumentar.

		PCR- <i>its1</i> reamplificação		Total
		Positivo	Negativo	
<i>hsp70</i>	Positivo	81	8	89
	Negativo	32	9	41
Total		113	17	130

Das 130 amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar, 113 foram positivas no teste PCR-*its1*-reamplificação, positividade de 86,9%, enquanto que o teste PCR-*hsp70* apresentou uma positividade de 68,4% (89/130). A diferença na positividade entre os dois testes analisados foi estatisticamente significativa ($p=0,0005$, teste exato de Fisher).

Como observamos na Tabela 8, 69,3% (90/130) dos casos apresentaram resultados concordantes em ambos os testes e 30,7% (40/130) apresentaram resultados discordantes. O teste de McNemar foi aplicado para medir a concordância ou discordância dos resultados obtidos pelas duas técnicas. Esta análise encontrou uma discordância de resultados, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,000276$).

4.4.4 Identificação de espécies de *Leishmania* por RFLP

Após constatar o potencial dos iniciadores analisados para detectar o de DNA do parasito por PCR, realizamos ensaios para verificar o potencial das técnicas de PCR-RFLP para identificação das espécies de leishmânias associadas à LT no Brasil. Os resultados das amplificações de DNA das espécies de leishmânias com os diferentes iniciadores estão resumidos na figura 6. Os resultados obtidos após digestão enzimática dos produtos amplificados (RFLP) foram abordados separadamente nos tópicos abaixo.

4.4.4.1 PCR- *kDNA*-RFLP- *HaeIII*

Os resultados de PCR-*kDNA*-RFLP-*HaeIII* (Figura 7) mostram que as espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* (*Viannia*): *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* após digestão enzimática de seus produtos de amplificação, apresentaram dois fragmentos: um de 80 pb e um de 40 pb. Em relação à espécie *L. (L.) amazonensis*, observamos apenas um fragmento de 120 pb após RFLP-*HaeIII*.

PCR- kDNA (120 pb)	Espécie	
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>
RFLP- <i>HaeIII</i> (pb)	80 40	120

Fonte: Volpini, 2004.

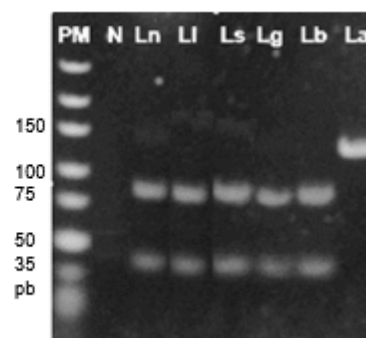


Figura 7- Produtos de PCR-*kDNA*-RFLP-*HaeIII*. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. **(PM)** Marcador de peso molecular, **N-** Controle negativo, **Ln-** *L. (V.) naiffi*; **LI-** *L. (V.) lainsoni*; **Ls-** *L. (V.) shawi*; **Lg-** *L. (V.) guyanensis*; **Lb-** *L. (V.) braziliensis*; **La-** *L. (L.) amazonensis*. Tabela auxiliar com os pesos moleculares gerados após RFLP baseada no trabalho de Volpini et al.²⁵

4.4.4.2 PCR- *its1*- RFLP-*HaeIII*

Os resultados deste ensaio demonstram que a técnica permitiu a identificação das seguintes espécies: *L. (V.) naiffi* e *L. (L.) amazonensis*.

O perfil eletroforético das espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, todas do subgênero *Viannia* foram semelhantes, com variação de poucos pares de bases (Figura 8).

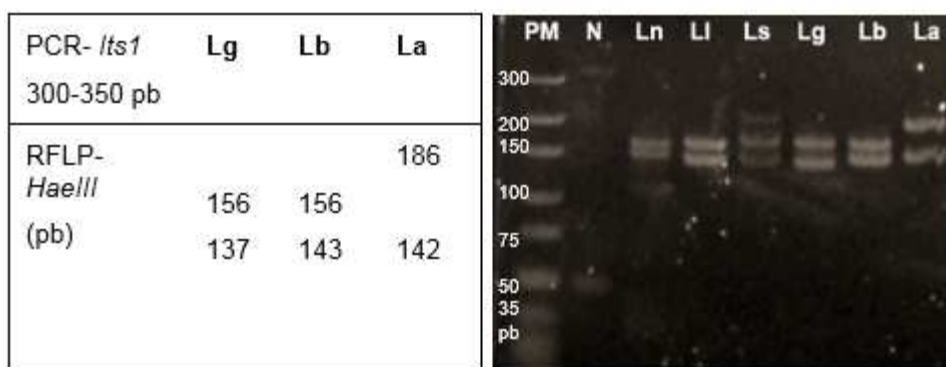


Figura 8- Produtos de PCR-*its1*-RFLP-*HaeIII*. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. **PM-** Marcador de peso molecular, **N-** Controle negativo, **Ln-** *L. (V.) naiffi*; **Ll-** *L. (V.) lainsoni*; **Ls-** *L. (V.) shawi*; **Lg-** *L. (V.) guyanensis*; **Lb-** *L. (V.) braziliensis*; **La-** *L. (L.) amazonensis*. Tabela auxiliar com os produtos de RFLP baseada em Schonian et al.³⁰

4.4.4.3 PCR-*hsp70*- RFLP-*HaeIII*-*BstUI*

O experimento de RFLP-*HaeIII*-*BstUI* dos produtos de amplificação de PCR-*hsp70* demonstraram que foi possível a identificação das espécies de leishmânias causadoras da LT no Brasil, a partir da combinação dos padrões eletroforéticos obtidos em RFLP-*HaeIII* e RFLP-*BstUI*, (Figura 9 A e B). A figura 9 A, mostra quatro perfis eletroforéticos das espécies de referência obtidos após PCR-*hsp70*-RFLP-*HaeIII* (a – d). O perfil a foi apresentado nas amostras das espécies *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) braziliensis*; o perfil b foi observado nas amostras das espécies *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) shawii*. As espécies *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* apresentaram perfis eletroforéticos distintos das outras espécies, c e d, respectivamente.

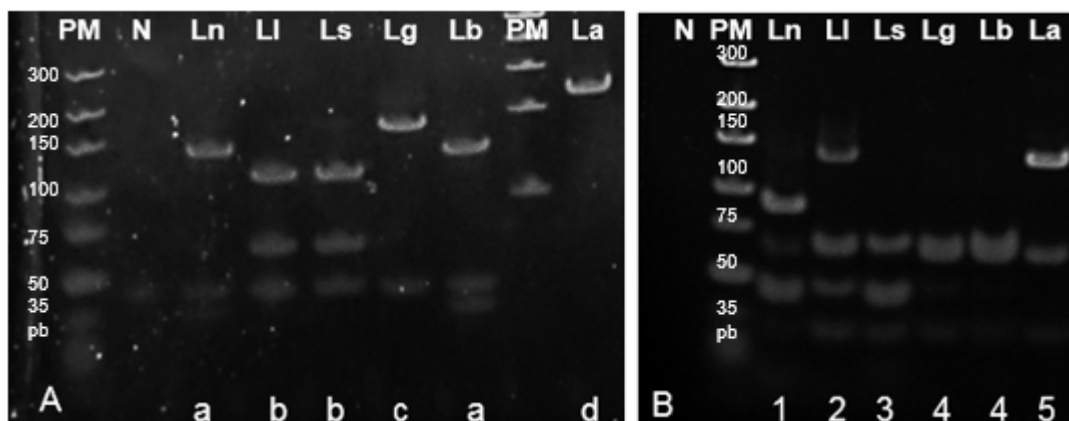


Figura 9- Produtos de digestão enzimática com *HaellI* (A) e com *BstUI* (B) dos produtos do PCR-*hsp70*. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. **PM-** Marcador de peso molecular, **N-** Controle negativo, **Ln-** *L. (V.) naiffi*; **LI-** *L. (V.) lainsoni*; **Ls-** *L. (V.) shawii*; **Lg-** *L. (V.) guyanensis*; **Lb-** *L. (V.) braziliensis*; **La-** *L. (L.) amazonensis*. Padrões eletroforéticos obtidos: **a-d:** RFLP-*HaellI* e **1-5:** RFLP-*BstUI*.

Os perfis eletroforéticos obtidos pela digestão enzimática dos amplificados de PCR-*hsp70* com *BstUI* estão representados na figura 9 B. Cinco perfis distintos foram observados para as seguintes espécies de leishmânias: 1- *L. (V.) naiffi*, 2- *L. (V.) lainsoni*, 3- *L. (V.) shawii*, 4- *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*; 5- *L. (L.) amazonensis*.

A tabela 9 mostra as combinações de perfis eletroforéticos RFLP-*HaellI* e RFLP-*BstUI* obtidas em para cada espécie de leishmânia.

Tabela 9- Combinação dos padrões eletroforéticos obtidos por PCR-*hsp70*-RFLP-*HaellI* e *BstUI* para identificação das espécies de leishmânias. Ln- *L. (V.) naiffi*; LI- *L. (V.) lainsoni*; Ls- *L. (V.) shawii*; Lg- *L. (V.) guyanensis*; Lb- *L. (V.) braziliensis*; La- *L. (L.) amazonensis*. Padrões eletroforéticos obtidos após digestão com: *HaellI*: a-d e *BstUI*: 1-5

PCR- <i>hsp70</i> 234 pb	Padrão eletroforético					
Leishmânias	Ln	LI	Ls	Lg	Lb	La
RFLP- <i>HaellI</i>	a	b	b	c	a	d
RFLP- <i>BstUI</i>	1	2	3	4	4	5
Combinação	a1	b2	b3	c4	a4	d5

4.4.4.4 PCR-*prp1*

Os resultados da PCR-*prp1* (Figura 10) em amostras de DNA extraídos de cultura de promastigotas de espécies de leishmânias associadas a LT mostram que não houve diferença no padrão de amplificação entre elas. Diferente do que foi observado na figura 6D. Houve diferença no padrão de amplificação apenas para *L. (L.) infantum chagasi*, espécie causadora da forma visceral da leishmaniose.

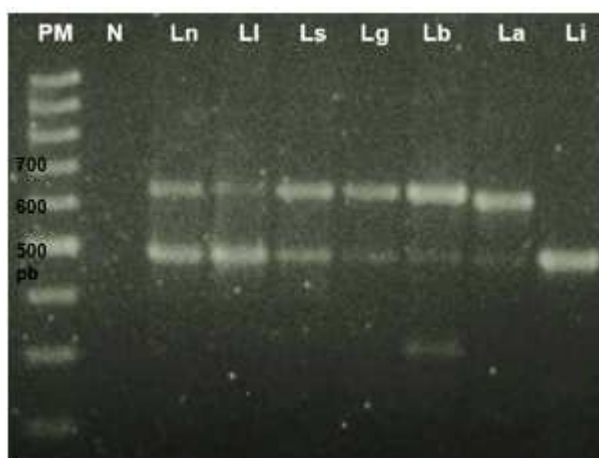


Figura 10- Produtos de amplificação da PCR-*prp1* de espécies de leishmânias associadas a LT no Brasil. Eletroforese em gel de agarose a 2%. **PM-** Marcador de peso molecular. **N-** Controle negativo, **Ln-** *L. (V.) naiffi*; **LI-** *L. (V.) lainsoni*; **Ls-** *L. (V.) shawi*; **Lg-** *L. (V.) guyanensis*; **Lb-** *L. (V.) braziliensis*; **La-** *L. (L.) amazonensis*; **Li-** *L. (L.) infantum chagasi*.

4.4.4.5 Identificação das espécies de leishmânias por PCR-RFLP em amostras de pacientes.

4.4.4.5.1 PCR- *kDNA*-RFLP- *HaeIII*

Das 140 amostras positivas para *kDNA*-PCR, após a digestão enzimática com *HaeIII*, foi possível verificar perfis eletroforéticos distintos para os subgêneros *Leishmania (Leishmania)* e *Leishmania (Viannia)*, conforme os perfis observados para as espécies de referência (Figura 7). Dezenove amostras (13,6%) apresentaram o perfil eletroforético semelhante ao perfil de *L. (Leishmania)* e 121 (86,4%) amostras perfil eletroforético foi semelhante ao de *L. (Viannia)* (Figura 11).

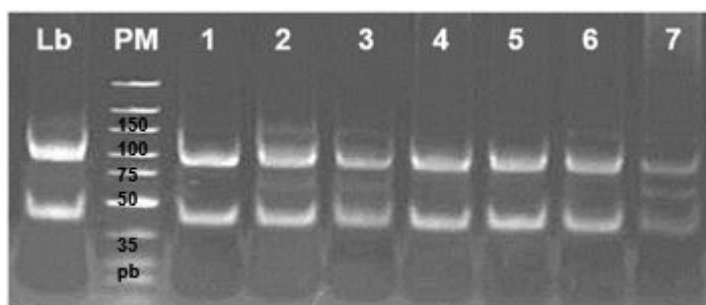


Figura 11- Produtos de PCR- *kDNA-RFLP-HaeIII* com DNA de lesões cutâneas ou mucosas. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. **PM-** Marcador de peso molecular. **Lb-** *L. (V.) braziliensis* (controle); **1-7:** Amostras de DNA de pacientes com LT.

4.4.4.5.2 PCR- *its1-RFLP- HaeIII*

A PCR- *its1* reamplificação foi positiva para 120 amostras de pacientes com LT (120/140), os amplificados foram submetidos a digestão enzimática com *HaeIII* e os perfis eletroforéticos obtidos foram comparados aos das espécies de referência (Figura 8). Oitenta amostras (80/120 – 66,7%) apresentaram perfil eletroforético semelhante ao perfil observado para *L. (V.) braziliensis* (Figura 12, amostras 3 - 5). Entretanto, não podemos afirmar que essas amostras são de *L. (V.) braziliensis*, pois como observado na Figura 8, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) guyanensis* apresentam perfil semelhante ao de *L. (V.) braziliensis*.

Vinte nove amostras (29/120 – 24,2%) apresentaram o perfil eletroforético semelhante ao observado para o subgênero *L. (Leishmania)* (Figura 12, amostra 1).

Observamos que 11 amostras (11/120- 9,1%) apresentaram perfil eletroforético diferente (Figura 12, amostras 2, 6 – 9) quando comparado com os perfis das espécies de referência (Figura 8).



Figura 12- Produtos de PCR-*its1*-RFLP-*HaeIII* com DNA de lesões cutâneas ou mucosas. Eletroforese em gel de poliacrilamida. **PM-** Marcador de peso molecular, **N-** controle negativo, **Lb-** *L. (V.) braziliensis* (controle); **1-9:** Amostras de DNA de pacientes com LT.

4.4.4.5.3 PCR- *hsp70*-RFLP- *HaeIII*- *BstUI*

Este ensaio foi realizado para 21 amostras de pacientes com LT. A combinação dos perfis eletroforéticos após digestão com as enzimas *HaeIII* e *BstUI* (Figura 9 e Tabela 9) possibilitou a identificação das espécies *L. (V.) braziliensis* (Figuras 13 A e B- amostras 1, 3, 4, 5) em 18 amostras (85,7%) e três amostras (14,3%) apresentaram combinações de perfis eletroforéticos diferente dos observados nas espécies de referência (Figura 9).

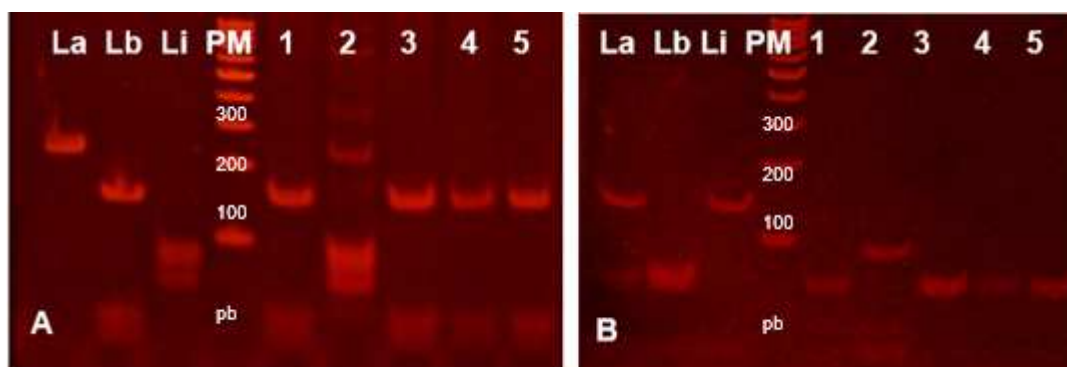


Figura 13- Produtos de PCR-*hsp70*-RFLP-*HaeIII*- *BstUI* com DNA de lesões cutâneas ou mucosas. Eletroforese em gel de poliacrilamida. **PM:** Marcador de peso molecular, **A-** Produtos de PCR-*hsp70*-RFLP-*HaeIII*. **B-** Produtos de PCR-*hsp70*-RFLP-*BstUI*. **La-** *L. (L.) amazonensis*, **Lb-** *L. (V.) braziliensis*; **Li-** *L. (L.) infantum chagasi*. 1-5: Amostras de DNA de lesões.

5 DISCUSSÃO

Dados recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS) relatam que a leishmaniose é endêmica em 98 países. Cerca de 20 espécies de parasitos do gênero *Leishmania* causam leishmaniose². Devido à grande diversidade de apresentações clínicas e distribuição geográfica, a leishmaniose pode ser considerada um grupo polimórfico de doenças, apresentando dificuldades de diagnóstico e muitas vezes, diferenças no tratamento e prognóstico¹. A elevada toxicidade do medicamento mais utilizado para o tratamento da leishmaniose, o antimônio pentavalente, também constitui um problema, além do aparecimento de cepas resistentes³¹

Atualmente, os casos de leishmaniose representam um grande problema de saúde pública não apenas para os países endêmicos, mas também para os países não endêmicos devido à grande mobilidade de pessoas, fazendo com que o número de casos relatados em países não endêmicos esteja aumentando. Estes novos casos estão principalmente relacionados a viagens ao exterior, migração e atividade militar em regiões endêmicas^{51,52}. Estas são algumas razões que fazem com que diferentes abordagens diagnósticas estejam sendo propostas, associando os testes moleculares aos testes rotineiramente utilizados no diagnóstico laboratorial da leishmaniose, tais como a pesquisa direta do parasito, a intradermoreação de Montenegro, isolamento do parasito em cultura. Mas, infelizmente, a disponibilidade desses testes varia de acordo com a instituição de saúde em que o atendimento é realizado.^{1,2,7}

Ciente desse panorama, os objetivos desse estudo foram padronizar e validar três testes moleculares capazes de detectar e determinar a(s) espécie(s) de leishmânia(s) implicada(s) no processo patológico (diagnóstico molecular), utilizando a PCR-RFLP a partir do DNA extraído de fragmentos de lesões de pele de pacientes atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas em São Paulo - SP.

Para constituir o grupo de estudo foram usados critérios de inclusão já consagrados na literatura, a saber, dados clínicos e epidemiológicos, além dos testes laboratoriais para a investigação da leishmaniose que se encontram disponíveis no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (pesquisa direta do parasito e intradermorreação de Montenegro). Além disso, os resultados positivos da PCR-*kDNA* em lesões de pele (realizados pelo nosso grupo de pesquisa) que também foram usados como critério de inclusão do estudo devido à elevada sensibilidade desta amplificação, apesar de apresentar problemas de especificidade. Trata-se, indiscutivelmente, da PCR mais utilizada atualmente para o diagnóstico molecular da leishmaniose^{20,25, 53}. A PCR-*kDNA* já foi usada por outros pesquisadores como critério de inclusão de amostras¹¹.

Apesar de termos inicialmente triado mais de duzentos pacientes e coletado as respectivas amostras, a falta de uma padronização na coleta dos dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (resultados dos exames específicos da investigação de leishmaniose disponíveis nos prontuários, a saber, pesquisa direta do parasito e intradermorreação de Montenegro), gerou uma redução significativa da casuística restando apenas 140 amostras que cumpriram todos os critérios de inclusão estabelecidos (APÊNDICE D). A fim de sanar este problema, desenvolvemos uma ficha a ser preenchida com todos os dados do paciente e enviada junto com o material biológico a ser analisado em laboratório (APÊNDICE C).

O grupo controle do estudo (contendo 102 amostras) não foi diferente do utilizado em outros trabalhos sendo constituído de amostras de pele e/ou mucosas provenientes de pacientes com outras doenças dermatológicas, além de amostras de sangue de voluntários sadios.

Um dos principais problemas enfrentados no decorrer do trabalho foi a escassez de material biológico coletado (fragmentos de pele e de mucosa), ocasionando recuperação de quantidades muito baixas de DNA, fato que limitou a

realização das amplificações, e nos forçou a procurar alternativas tais como as reamplificações e o uso do kit Repli-g. As reamplificações podem, de fato, aumentar o risco de contaminação das amostras, resultando em falso-positivos, fato que contraindicaria o uso rotineiro desta estratégia no diagnóstico molecular³⁰. O uso do kit Repli-g não apresenta este inconveniente, no entanto, aumenta significativamente o custo do teste. De qualquer forma, seria importante que algum procedimento neste sentido seja adotado para que exista uma disponibilidade de DNA maior a ser testada, principalmente nos casos de lesões localizadas na face dos pacientes. Como a biópsia é considerada um procedimento invasivo, não seria cabível solicitar a repetição da coleta, notadamente em pacientes pediátricos e/ou em lesões faciais. Essa pequena disponibilidade de material também foi crucial no processo de interrupção da avaliação do quarto par de iniciadores que inicialmente pretendíamos utilizar nesse trabalho, os iniciadores *prp1* dirigidos para o gene de um membro da família das glicoproteínas-P de membrana, a PRP1, proteína essa descrita pelo nosso grupo de pesquisa e que está diretamente relacionada com o mecanismo de resistência da Pentamidina, uma droga de segunda escolha para o tratamento das leishmanioses^{31,32}.

Com relação à etapa de padronização das técnicas moleculares, a expectativa era de que o alto número de cópias de cada uma das sequências alvo de amplificação presente no genoma do parasito fizesse com que a PCR-*kDNA* fosse a reação mais sensível (10.000 cópias/parasito)^{26,35,36}, seguida da PCR-*its1* (40-200 cópias/parasito)^{21,27,30,37,38}, da PCR-*hsp70* (5-10 cópias/parasito)³⁹⁻⁴² e finalmente da PCR-*prp1* (1 cópia/parasito)^{31,32}, que deveria ser a menos sensível dentre todas as técnicas. Os testes para a determinação da sensibilidade analítica realizados apenas com DNA do parasito, ou com o DNA do parasito acrescido de 50 ng de DNA humano confirmaram essas expectativas.

No que se refere à detecção de leishmânias nas amostras de DNA extraídas de fragmentos de pele, não foram apresentadas as detecções realizadas com a PCR-*kDNA* por elas terem sido positivas em todas as amostras incluídas no estudo (100% de positividade), o que fez com que esses nossos resultados passassem a compor parte dos critérios de inclusão adotados para a determinação da amostragem inicial do grupo de estudo. Também não foram apresentadas e comparadas as detecções da PCR-*prp1* pelo fato deste sistema não ter sido capaz de detectar o parasita em nenhuma das 140 amostras clínicas testadas, provavelmente devido a presença de apenas uma cópia do gene *prp1* no parasito.

Sendo assim, os parâmetros de desempenho (sensibilidade, especificidade, valores preditivos, *likelihood ratio* e eficiência) foram calculados apenas para as PCR-*its1* e PCR-*hsp70* (Tabela 7), e a comparação entre as técnicas também foi realizada apenas para estas duas amplificações (Tabela 8). Em relação à especificidade, se considerarmos o teste das amostras verdadeiramente positivas e verdadeiramente negativas, as duas amplificações tiveram excelente desempenho (100%). Em relação à sensibilidade, as comparações foram realizadas com os dados obtidos após a última etapa de análise, que no caso da PCR-*its1* foi a reamplificação, e no caso da PCR-*hsp70* foi a amplificação após o uso do kit Repli-g, uma vez que a reamplificação não funcionou para o alvo *hsp70*. A análise estatística revelou a existência de diferença estatisticamente significativa entre os resultados (teste exato de Fisher), e discordância dos resultados obtidos pelas duas técnicas, indicando superioridade da detecção da PCR-*its1* (teste de McNemar). Vinte das 22 amostras com resultados discordantes para os dois testes eram de fragmentos de lesões mucosas. As lesões mucosas caracteristicamente apresentam baixa carga parasitária o que pode ter diminuído o potencial de detecção das técnicas.

Os outros parâmetros de desempenho (valores preditivos, *likelihood ratio* e eficiência) também foram favoráveis ao PCR-*its1*.

Bensoussan et al.²¹ utilizaram três PCR para o diagnóstico da leishmaniose e estas amplificações foram comparadas e validadas de acordo com os resultados de culturas de parasitos e pesquisa direta em esfregaços utilizando 92 amostras de casos suspeitos de leishmaniose tegumentar em Israel e na Cisjordânia. A PCR-*kDNA* mostrou a sensibilidade mais elevada (98,7%), diagnosticando corretamente 77/78 das amostras positivas confirmadas, seguida pela PCR-*its1* que detectou 71/78 positivos (91,0%) e da PCR-mini-exon que detectou 42/78 positivos (53,8%). A cultura do parasito e a microscopia detectaram isoladamente 62,8% (49/78) e 74,4% (58/78) das amostras positivas, respectivamente, enquanto que os resultados de cultura associados aos da microscopia tiveram uma sensibilidade de 83,3% (65/78). Exceto para a PCR-*kDNA* que apresentou seis resultados falso-positivos, todos os outros ensaios tiveram 100% de especificidade. Comparando os resultados do estudo de Bensoussan et al.²¹ e os do presente estudo, as sensibilidades da PCR-*kDNA* (98,7% versus 100% em nosso estudo), e da PCR-*its1* (91% versus 85,7% em nosso estudo) foram similares. Não obstante, no trabalho de Bensoussan et al.²¹ não foi realizada a reamplificação, uma vez que os autores extraíram DNA a partir de fragmentos de pele contendo quantidade muito maior de material (coleta por excisão total das lesões de pele com bisturi, seguida de aspirado das lesões), o que apesar de resultar em um maior rendimento do processo, é muito mais invasivo do que o procedimento adotado pelo nosso grupo de pesquisa, e que na análise final, geraram resultados considerados similares. Com relação à especificidade, Bensoussan et al.²¹ referiram que apenas a PCR-*kDNA* apresentou resultados falso-positivos, enquanto que na presente pesquisa, todos os alvos testados apresentaram reações cruzadas quando o DNA de diferentes tripanosomatídeos foi testado. No entanto, Bensoussan et al.²¹ não descreveram testes de especificidade semelhantes aos nossos, apenas que algumas amostras de pacientes sem leishmaniose tiveram resultado positivo na PCR-*kDNA*.

Fagundes et al.⁵⁴ investigaram o valor diagnóstico de uma PCR-*kDNA* em relação aos outros métodos rotineiros de diagnóstico da leishmaniose tegumentar, em um centro de referência. Foram analisadas amostras de 130 pacientes com diagnóstico confirmado de LT, 15 pacientes com outras doenças, e 23 pacientes com lesões sugestivas de LT, porém sem confirmação parasitológica. A PCR-*kDNA* apresentou sensibilidade de 92,3%, especificidade de 99,2%, com valor preditivo positivo de 99,2%, valor preditivo negativo de 58,3%, *likelihood ratio* positivo de 13,84 e negativo de 0,08. Estes valores se aproximam de 100%, confirmando que a PCR-*kDNA* é um excelente teste de triagem de pacientes. A PCR-*kDNA* confirmou 13 dos 23 casos sugestivos de LT, sete dos quais responderam bem ao tratamento, enquanto os seis restantes apresentaram cura espontânea. Os autores concluíram que a PCR-*kDNA* deveria ser incluída na rotina diagnóstica de LT, principalmente nos casos em que existe suspeita clínica, e em que os testes rotineiramente empregados no diagnóstico forem negativos. Esta sugestão dos autores vai de encontro à nossa iniciativa de usar a PCR-*kDNA* como critério de inclusão do presente estudo.

Graça et al.²⁷ compararam o desempenho da amplificação por PCR no diagnóstico molecular da LT utilizando como alvos iniciadores dirigidos para: *kDNA*, *hsp70* (região de 1400 pb e região de 234 pb), *its1* e *g6pd*. As amplificações foram padronizadas com iniciadores do gene *hsp70* que produziram fragmentos com peso molecular variando de 230-390 pb. O DNA de setenta cepas de leishmânias foram analisadas, incluindo sete cepas de espécies de referência e 63 cepas de espécies variadas previamente identificadas. A análise dos resultados das cepas das espécies de referência indicou a existência de uma região de 234 pb no gene *hsp70* que poderia ser usada como alvo da PCR em amplificações bastante sensíveis que também teriam a capacidade de discriminar espécies de leishmânias após RFLP. Para a validação dos testes, foi utilizado um painel de 99 amostras de DNA extraídas

de fragmentos de tecidos coletados de pacientes com diagnóstico confirmado de LT. Os iniciadores que amplificam fragmento de 234 pb foram exatamente os utilizados na presente pesquisa. Apesar da sensibilidade da PCR-*kDNA* ser reconhecidamente mais elevada, as PCR-*hsp70* e *its1* foram capazes de detectar mais de 70% das amostras. Em nosso estudo, a sensibilidade das ampliações finais da PCR-*its1* foi mais elevada (85,7%), porém a da PCR-*hsp70* foi similar, com sensibilidade de 68,4%.

Montalvo et al.⁵⁵ visando aumentar a sensibilidade e a especificidade da PCR-*hsp70* propuseram novos pares de iniciadores para este alvo e posteriormente enzimas de restrição para a identificação de espécies. Seguindo a análise *in silico* de sequências disponíveis, três novos pares de iniciadores e enzimas de restrição foram testados usando um painel contendo 121 cepas de 14 espécies de leishmânias, além de outros agentes infecciosos (testes de especificidade) e amostras clínicas. O limite de detecção das PCR com os novos iniciadores variou entre 0,05 e 0,5 genomas do parasito. Estes novos ensaios de PCR foram capazes de amplificar o DNA do parasito em amostras clínicas de forma mais eficiente, e sem problemas de especificidade. Considerando que 1 parasito possui cerca de 85 femtogramas de DNA¹¹, em nosso estudo a PCR-*kDNA* e a PCR-*its1* detectaram o DNA do parasito até 500 fg de DNA de leishmânia (cerca de 5,88 genomas do parasito), em reações com volume total de 50 µL. A PCR-*hsp70* detectou até (400 fg) (4,7 parasitos) e a PCR-*prp1* até 5 ng de DNA de parasito (59 x10³ parasitos) (TABELA 6). Nosso estudo apresentou detecção menor do que apresentado por Montalvo et al.⁵⁵, no entanto, a PCR-*kDNA* diagnosticou a doença em 37 pacientes com diagnóstico clínico-epidemiológico de LT com resultados inconclusivos para pesquisa direta, isolamento e cultivo *in vitro* e IDRM. Destes 37 pacientes, a LT também foi confirmada em 30 indivíduos por PCR-*its1* e em 20 por PCR-*hsp70*.

Silva et al.⁵⁶ também compararam o desempenho da amplificação por PCR-*kDNA* no diagnóstico molecular da LT, porém utilizando iniciadores dirigidos para diferentes regiões do *kDNA* a saber: L150 e L152 na região conservada da sequência, 13Y e 13Z na região variável e três outros iniciadores, também da região variável, LINR4/LIN17/LIN19, que foram usados em amplificações do tipo semi-nested (snPCR). Os resultados foram evidenciados por bandas de 120; 720 e 670 pb para L150/L152, 13Y/13Z e snPCR, respectivamente. As positivities para L150/L152, 13Y/13Z e snPCR foram 93,7; 68,7 e 84,4 ($p < 0,05$) em casos confirmados de LT, respectivamente. Estes resultados são bem inferiores aos encontrados no presente estudo em relação à PCR-*kDNA*, que apresentou sensibilidade de 100%. Por outro lado, os resultados da semi-nested PCR e 13Y/13Z (84,4% e 68,7% de sensibilidade, respectivamente) relatados por Silva et al.⁵⁶ são similares aos que encontramos na reamplificação do alvo *its1* (85,7%), e na amplificação da PCR-*hsp70* após o uso do kit Repli-G (68,4%).

Fraga et al.⁴² padronizaram três novas PCR-*hsp70*, denominadas PCR-G, PCR-F e PCR-N, para a detecção de *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) guyanensis* em 89 amostras clínicas de um total de 73 pacientes peruanos com LT, apresentando sensibilidade analítica de 1,0 pg, 0,1 pg e 0,01 pg, respectivamente. A sensibilidade global das três PCR quando as amostras de pacientes foram testadas foi de 37%, 68% e 85%, respectivamente, mas esta porcentagem apresentou variação de acordo com o tipo de material biológico (fragmentos de lesões, aspirados e raspados), tendo sido mais elevada em ensaios com DNA extraído de fragmentos de lesões. Esse resultado pode ser considerado promissor se considerarmos que cerca de um terço das amostras eram de *L. (V.) braziliensis* que conhecidamente contém apenas duas cópias do gene *hsp70*. Em comparação com nossos resultados verificamos uma sensibilidade analítica muito maior (a detecção obtida para a PCR-*hsp70* foi de até 400 fg), enquanto que a

sensibilidade da PCR-*hsp70* nas nossas 140 amostras humanas (validação), após uso do kit Repli-G, foi de 68,4%, um percentual semelhante àquele encontrado para a PCR-F do estudo de Fraga et al.⁴², porém inferior ao da PCR-N

Em uma revisão sistemática da literatura por metanálise com 14 trabalhos publicados no período de 1999 a 2013, Gomes et al.⁵⁷ avaliaram a capacidade da PCR para detectar casos de LT. Utilizando a PCR como ferramenta diagnóstica, sendo nove estudos realizados apenas com PCR-*kDNA*, três estudos com a PCR-*kDNA* em conjunto com outros alvos, e dois estudos usando apenas outros alvos (como: *gp63* e *18S rRNA*). Dentre os 14 estudos, todos foram realizados na América do Sul, sendo sete brasileiros (quatro realizados no Rio de Janeiro e três no Paraná) concluiu-se que a PCR-*kDNA* é a mais utilizada. Com relação às amostras analisadas, sete estudos empregaram DNA proveniente de fragmentos de lesões cutâneas ou muco-cutâneas, três empregaram amostras de DNA de sangue periférico, duas usaram material coletado em lesões por *swab*, um estudo utilizou material aspirado de lesões e outro empregou amostras de urina. A especificidade dos testes moleculares girou em torno de 100% em todos os 14 estudos, corroborando com a elevada especificidade também encontrada nos nossos resultados com a PCR-*kDNA* (100%). Diferenças mais significativas foram encontradas quando comparamos a sensibilidade das detecções. A metanálise, que só foi possível para os ensaios com amostras de fragmentos de lesões, revelou uma sensibilidade de 71% nos testes moleculares [intervalo de confiança de 95% (IC); 0,59 -0,81] e uma especificidade de 93% (IC de 95%; 0,83 - 0,98). Considerando os resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa nesse presente estudo, verificamos que após a primeira amplificação da PCR-*its1*, apenas 57,1% das amostras clínicas foram amplificadas, percentual mais baixo que o apontado na metanálise. Porém após a reamplificação, o percentual atingiu 85,7%, um valor com mais de 14 pontos

percentuais acima ao da metanálise. Já em relação à porcentagem de detecção, quando utilizamos a PCR-*hsp70* após Repli-G, obtivemos um percentual comparável ao indicado na metanálise (68,4%). Da mesma forma que relatamos aqui, alguns dos principais problemas apontados por Gomes et al.⁵⁷ foram as variações encontradas na qualidade do material coletado e na padronização das amplificações.

A identificação da espécie de leishmânia infectante é um fator importante para direcionar o prognóstico e tratamento da doença, pois cada espécie apresenta hábitos e tropismos distintos que, combinados com a resposta imune do paciente, podem resultar em formas clínicas com gravidade e evolução distintas^{1,12} Todas as espécies identificadas no Brasil, associadas à LT, podem evoluir para autocura, no entanto, quando a doença é causada por *L. (L.) amazonensis* pode evoluir para a forma disseminada e quando relacionada à *L. (V.) braziliensis* desenvolve a forma mucocutânea^{1,12,19}

Atualmente, a identificação da espécie não é realizada como rotina laboratorial, pois o teste de referência (eletroforese de isoenzimas) é extremamente laborioso e exige o isolamento e cultivo do parasito proveniente da lesão, o que o torna inviável do ponto de vista da rotina hospitalar. Assim, este estudo teve como objetivo verificar o potencial da utilização das técnicas de PCR-RFLP em DNA extraído de amostras de pacientes para identificar a espécie de leishmânia infectante.

Nossos ensaios de PCR-*kDNA*-RFLP-*HaeIII* foram baseados no trabalho de Volpini et al.²⁵, que utilizaram apenas cepas de referência de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* visando a diferenciação destas duas espécies em região de Minas onde estas espécies são endêmicas. No estudo de Volpini et al.²⁵, a técnica de PCR-RFLP foi comparada com os resultados de PCR-hibridização e apenas uma amostra de um total de 65 foi discordante, resultados com alto índice de concordância (κ =

91.5 ± 12,3). Em nosso estudo incluímos inicialmente seis espécies de leishmânia associadas à LT no Brasil (Figura 7) e verificamos os perfis eletroforéticos semelhantes aos descritos pelos autores para *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Constatamos que as outras espécies pertencentes ao subgênero (*Viannia*), também apresentaram perfil de digestão semelhante ao verificado para *L. (V.) braziliensis*, ou seja, dois fragmentos (um de 80 pb e outro de 40 pb). Desta forma, constatamos que não foi possível identificar as espécies do subgênero (*Viannia*) por esta técnica utilizando as espécies de referência testadas.

Da mesma forma, quando utilizamos a técnica de PCR-*kDNA*-RFLP-*HaeIII* padronizada acima para a identificação das espécies de leishmânias nas 140 amostras de DNA humanas, verificamos que a maioria das amostras (121/140) apresentou perfil eletroforético característico das espécies pertencentes ao subgênero (*Viannia*), ou seja, dois fragmentos de 80 e 40 pb. Essa técnica, no entanto, pode ser aplicada com maior facilidade na rotina hospitalar devido à sua alta sensibilidade e por apresentar um procedimento mais simples de análise dos resultados finais.

Schonian et al.³⁰, compararam duas técnicas de PCR utilizando os iniciadores para *ssu rRNA* e *its1* para detecção e identificação das espécies de leishmânias de relevância médica. Os autores relatam maior sensibilidade da PCR- *ssu rRNA*, no entanto, recomendam a reamplificação com os iniciadores para *its1* pois permite obter melhores níveis de sensibilidade na identificação da espécie infectante após a digestão enzimática com *HaeIII* dos produtos da PCR-*its1*. O artigo relata ainda que a identificação das espécies pertencentes ao complexo *L. (V.) braziliensis* (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* *L. (V.) panamensis*) é difícil, pois estas espécies apresentam o mesmo perfil eletroforético após a digestão. Os resultados

apresentados em nosso trabalho revelaram que quando executamos a técnica de PCR-*its1*-RFLP-*HaeIII* com as espécies de referência foi possível a identificação das espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) naiffi* (Figura 8). As demais espécies testadas, todas do subgênero (*Viannia*), apresentaram perfil eletroforético semelhante, não sendo possível, portanto, identificá-las por esse método.

Quando esse procedimento foi utilizado nas 120 amostras (120/140) positivas após a amplificação por PCR-*its1* foi possível determinar apenas as amostras infectadas com *Leishmania (L.) amazonensis* (29/120) (Figura 8). Oitenta amostras (80/120) apresentaram perfil eletroforético similar ao apresentado pelas espécies de referência do subgênero *L. (Viannia)* e 11 amostras apresentaram perfil eletroforético distinto e não foram identificadas. É bem possível que não houvesse nenhuma amostra humana contaminada com *L. (V.) naiffi* em nossa amostragem, o que corrobora com o resultado encontrado. Entretanto é importante ressaltar que a menor sensibilidade da PCR-*its1* requer que os produtos de amplificação sejam submetidos a uma segunda PCR e, posteriormente digeridos com *HaeIII*. Ou seja, um procedimento mais complexo para a rotina hospitalar do que o empregado na PCR-*kDNA*-RFLP-*HaeIII*.

O ensaio de PCR-*hsp70*-RFLP-*HaeIII*-*BstUI* utilizando DNAs de espécies referência demonstrou que é possível a identificação das seis espécies relacionadas à LT no Brasil pela combinação dos perfis eletroforéticos obtidos após digestão dos amplificados com as enzimas de restrição indicadas (Figura 9 e Tabela 9). Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Graça et al.²⁷ que demonstrou o potencial desta técnica na identificação de espécies de leishmânias de interesse médico.

A técnica de PCR-*hsp70*-RFLP-*HaeIII*-*BstUI* foi realizada em seguida com o DNA das amostras humanas. Lembramos que todo o processo parte de uma baixa sensibilidade uma vez que as 140 amostras de DNA proveniente de lesão foram previamente amplificadas com o kit Repli-G justamente na tentativa de aumentar essa sensibilidade e poupar amostras de DNA de paciente. Apenas 21 amostras foram submetidas as digestões enzimáticas para identificação das espécies infectantes. Em dezoito amostras fomos bem-sucedidos em identificar a espécie de leishmânias infectante, todas foram identificadas como *L. (V). braziliensis*. No entanto, três (3/21) amostras não puderam ser identificadas pela técnica, uma vez que não foram observadas as combinações esperadas dos perfis eletroforéticos dos produtos de digestão por *HaeIII* e *BstUI*. Apesar do potencial da técnica PCR-*hsp70*-RFLP-*HaeIII*-*BstUI* em identificar as espécies de leishmânias associadas a LT, concluímos que o processo de realização de duas digestões enzimáticas, eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos digeridos e comparação dos perfis eletroforéticos para obter a identificação, torna-o demasiado complexo para utilização como rotina laboratorial. Além disso, lembramos que para essa técnica, o uso do kit Repli-G foi essencial para o aumento do material disponível para realizar e repetir todos os processos envolvidos para a identificação da espécie infectante, o que eleva o custo da técnica.

Os iniciadores para *prp1* não detectaram o DNA do parasito nas amostras de pacientes, provavelmente pelo gene alvo ser de cópia única. Realizamos um ensaio para elevar a sensibilidade da reação ao reamplificar os produtos da primeira PCR, mas não obtivemos sucesso. No ensaio de especificidade (Figura 6D) com DNA de cultura de parasitos, observou-se uma diferença no número e tamanho dos fragmentos amplificados das espécies de leishmânias, o que poderia ser utilizado como uma ferramenta para identificação das espécies apenas com a PCR. No

entanto, na figura 10, verificamos a ausência do fragmento de aproximadamente 700 pb, observado para as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) shawi* no ensaio de especificidade (Figura 6D). Assim, é necessário um estudo com diversas cepas de leishmânias para verificar a diferença no padrão de amplificação.

Os resultados das identificações por PCR-RFLP com os diferentes marcadores, embora realizadas com número de amostras distinto, mostrou que a maioria das nossas amostras apresentaram padrão eletroforético pertencente as espécies do subgênero *Viannia*: 86,42% (121/140) amostras por PCR-*kDNA*-RFLP-*HaeIII*, 66,66% (80/120) por PCR-*its1*-RFLP-*HaeIII* e 85,71% (18/21) *L. (V.) braziliensis* por PCR-*hsp70*-RFLP-*HaeIII*-*BstUI*. Este dado pode nos indicar que a maioria dos pacientes do nosso grupo de estudo esteja infectada por *L. (V.) braziliensis*, que é uma das espécies predominante no Brasil¹ e é a espécie que está relacionada com a LM, ressaltando assim, a importância de um diagnóstico preciso para que o paciente seja devidamente tratado ou monitorado para diminuir os prejuízos causados pela doença.

A outra espécie identificada em nosso grupo controle foi a *L. (L.) amazonensis*, espécie também com ampla distribuição geográfica, associada a forma clínica difusa¹.

Atualmente, não há conduta terapêutica baseada na identificação da espécie do parasito, recomendada pelo Ministério da Saúde do Brasil¹. Desta forma, entendemos que o mais importante seria confirmar a suspeita clínica de LT, tratar o paciente de acordo com sua manifestação clínica e monitorá-lo periodicamente para avaliar a progressão da doença. Com base nesses fatos, o uso da PCR-*kDNA* pode contribuir para o diagnóstico da LT, pois apresenta execução simples, alta sensibilidade e custo menor do que o das outras amplificações por PCR analisadas²⁰.

Os iniciadores para a PCR-*kDNA* utilizados nesse trabalho apresentaram reação cruzada com outros tripanossomatídeos, no entanto, as manifestações clínicas de pacientes com LT são distintas das apresentadas por pacientes com Doença de Chagas (único tripanosomatídeo que causa uma doença humana; causada pelo *T. cruzi*) ou se, causam lesões cutâneas, estas são raríssimas e de caráter oportunista em pacientes imunocomprometidos⁵⁸.

Na maior parte do país, há predominância das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, que podem ser diferenciadas pelo PCR-*kDNA*-RFLP-*HaeIII*.

Recomendamos a identificação das espécies de leishmânias infectantes por PCR-*hsp70*-RFLP-*HaeIII*-*BstUI* quando o paciente relatar como local provável de infecção regiões onde há várias espécies de leishmânias endêmicas, ou quando o paciente não responde ao tratamento.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram as seguintes conclusões:

- A PCR-*kDNA* foi a técnica com maior sensibilidade do estudo e com maior facilidade de execução, podendo ser recomendada para a utilização na rotina hospitalar.
- O segundo melhor teste para detecção do parasito foi a PCR-*its1*, porém requer a dupla amplificação para aumentar a sensibilidade da técnica. As técnicas de PCR-*kDNA*-RFLP-*HaeIII* e PCR-*its1*-RFLP-*HaeIII*, apesar da maior sensibilidade e facilidade de execução, não foram eficazes para identificação das espécies de leishmânias do subgênero *Viannia*.
- A PCR com o iniciador para o gene *prp1* não detectou o parasito em amostras de DNA de pacientes com LT, mas apresenta potencial para uso em identificação de espécies de leishmânias.
- A amplificação genômica de amostras de DNA de lesões de pacientes com LT com o kit Repli-G (Qiagen®) permitiu o aumento de material disponível para os ensaios de PCR-*hsp70*-RFLP-*HaeIII*-*Bstul* e aumentou a sensibilidade desta técnica.
- A PCR-*hsp70*-RFLP-*HaeIII*-*Bstul* foi a única técnica do estudo capaz de identificar todas as espécies de leishmânias associadas a LT. No entanto, a técnica é trabalhosa e de custo elevado, pois envolve muitas etapas de preparação das amostras, reagentes e material além de requerer pessoal qualificado para sua realização.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.
2. World Health Organization. Leishmaniasis- Magnitude of the problem. WHO. [Internet] [cited 2015 aug 8] Available from: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html.
3. Medeiros JM. Leishmanioses: visceral e tegumentar. In: Hinrichsen LSA, editor. DIP: doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 398-409
4. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**. 2012;**7(5):1-12**.
5. Brasil. Ministério da Saúde Brasil. Guia de Vigilância Epidemiológica. Caderno 11- Leishmaniose Tegumentar Americana, Leishmaniose Visceral. 7º ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.
6. Brasil. SINAN. Portal da Saúde. [Internet] [citado 2015 ago 30]. Disponível em: portaldasaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LT-Casos.pdf.
7. Arevalo J. Diagnóstico Laboratorial da Infecção por *Leishmania* sp. In Barral A, Costa JML, editores. Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas. Gráfica Contexto: Salvador; 2011. p. 146-153.
8. Lainson R, Shaw, JJ. Evolution, Classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. (Editors). The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Academic Press: London, 1987. p. 1-20.
9. Saf'Janova VM. Classification of the genus *Leishmania* Ross. In: All union society of protozoologists. The *Leishmanias*. Leningrad: Academy of Science; 1982. p. 95-101,
10. Iborra S, Abánades DR, Bonay P, Soto M. Biología Molecular de *Leishmania*: Regulación de la expresión génica. In: Barral A, Costa JML, editores. Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas. Gráfica Contexto: Salvador; 2011. p. 11-24.
11. Jara M, Adai V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (Viannia) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. **J Clin Microbiol**. 2013 Jun;**51(6):1826-33**.
12. Costa JML. Modalidades Clínicas da Leishmaniose Tegumentar. In Barral A, Costa JML, editores. Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas. Gráfica Contexto: Salvador; 2011. p. 138-145.

13. Teixeira LAS, Da Cruz AM. Leishmanioses. In: Ferreira AW, Moraes SL, editores. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes: correlações clínico-laboratoriais*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p. 3-11.
14. Rabello A, Orsini M, Disch J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. **Ann Trop Med Parasitol**. 2003 Oct;**97** Suppl 1:17-28.
15. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, et al.. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clin Microbiol Rev**. 2008 Apr;**21**(2):334-59.
16. Lindoso JA, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MI, Oyafuso LK, Amato VS, et al. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. **Br J Dermatol**. 2009 Feb;**160**(2):311-8.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de Pacientes com a Coinfecção Leishmania - HIV. 1. Brasília: Ministério da Saúde; 2015.
18. Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**. 2010 Apr;**8**(4):419-33.
19. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**. 2007 Sep;**7**(9):581-96.
20. Satow MM, Yamashiro-Kanashiro EH, Rocha MC, Oyafuso LK, Soler RC, Cotrim PC, et al. Applicability of *kDNA*-PCR for routine diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a tertiary reference hospital. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 2013 Nov-Dec;**55**(6):393-9.
21. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **J Clin Microbiol**. 2006. Apr;**44**(4):1435-9.
22. Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. **J Clin Microbiol**. 2004 May;**42**(5):2294-7.
23. Garcia AL, Parrado R, De Doncker S, Bermudez H, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 2007 Apr;**101**(4):368-71.
24. da Silva LA, de Sousa C dos S, da Graça GC, Porrozzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the *hsp70* gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. **Infect Genet Evol**. 2010 Jan;**10**(1):77-83.

25. Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.** 2004 Mar;**90(1):31-7.**
26. Degraeve W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*-a mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1994 Jul-Sep;**89(3):463-9.**
27. Da Graça C, Volpini AC, Romero GAS, de Oliveira Neto MP, Hueb M, Porrozzi R, et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2012 Aug;**107(5):664-74.**
28. Veland N, Boggild AK, Valencia C, Valencia BM, Llanos-Cuentas A, Van der Auwera G, et al. *Leishmania (Viannia)* species identification on clinical samples from cutaneous leishmaniasis patients in Peru: assessment of a molecular stepwise approach. **J Clin Microbiol.** 2012 Feb;**50(2):495-8.**
29. Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **J Clin Microbiol.** 2003 Feb;**41(2):540-6.**
30. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2003 Sep;**47(1):349-58.**
31. Coelho, A. C. Papel do transportador ABC PRP1 na resistência à pentamidina em *Leishmania* spp. [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007
32. Coelho AC, Beverley SM, Cotrim PC. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. **Mol Biochem Parasitol.** 2003 Aug **31;130(2):83-90.**
33. Simpson AG, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitol.** 2006 Apr;**22(4):168-74.**
34. Aphasizhev R, Aphasizheva I. Mitochondrial RNA processing in trypanosomes. **Res. Microbiol.** 2011 Sep;**162(7):655-63.**
35. Singh N, Curran MD, Middleton D, Rastogi AK. Characterization of kinetoplast DNA minicircles of an Indian isolate of *Leishmania donovani*. **Acta Trop.** 1999 Oct **15;73(3):313-9.**
36. Rodrigues EH, Soares FC, Werkhäuser RP, de Brito ME, Fernandes O, Abath FG, et al. The compositional landscape of minicircle sequences isolated from active lesions and scars of American cutaneous leishmaniasis. **Parasit Vectors.** 2013 Aug **7;6:228**
37. Kumar R, Bumb RA, Ansari NA, Mehta RD, Salotra P. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Bikaner, India: parasite

- identification and characterization using molecular and immunologic tools. **Am J Trop Med Hyg.** 2007 May;76(5):896-901.
38. Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **J Infect Dis.** 2004 May 1;189(9):1729-33.
 39. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science.** 2002 Mar 8;295(5561):1852-8.
 40. Folgueira C, Cañavate C, Chicharro C, Requena JM. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. **Parasitology.** 2007 Mar;134(Pt 3):369-77.
 41. Van der Auwera G, Maes I, De Doncker S, Ravel C, Cnops L, Van Esbroeck et al. Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics. **Euro Surveill.** 2013 Jul 25;18(30):20543
 42. Fraga J, Veland N, Montalvo AM, Praet N, Boggild AK, Valencia BM, et al. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2012 Oct;74(2):142-50.
 43. Chicharro C, Llanes-Acevedo IP, García E, Nieto J, Moreno J, Cruz I. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. **Euro Surveill.** 2013 Jul 25;18(30):20545
 44. Leelayoova S, Siripattanapipong S, Hitakarun A, Kato H, Tan-ariya P, Siriyasatien P, et al. Multilocus characterization and phylogenetic analysis of *Leishmania siamensis* isolated from autochthonous visceral leishmaniasis cases, southern Thailand. **BMC Microbiol.** 2013 Mar 18;13:60.
 45. Giorgobiani E, Lawyer PG, Babuadze G, Dolidze N, Jochim RC, Tskhvaradze L, et al. Incrimination of *Phlebotomus kandelakii* and *Phlebotomus balcanicus* as vectors of *Leishmania infantum* in Tbilisi, Georgia. **PLoS Negl Trop Dis.** 2012;6(4):e1609
 46. Zhang CY, Lu XJ, Du XQ, Jian J, Shu L, Ma Y. Phylogenetic and evolutionary analysis of Chinese *Leishmania* isolates based on multilocus sequence typing. **PLoS One.** 2013 Apr 30;8(4):e63124.
 47. Leprohon P, Légaré D, Girard I, Papadopoulou B, Ouellette M. Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. **Eukaryot Cell.** 2006 Oct;5(10):1713-25.
 48. Medina-Acosta E, Cross GA. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. **Mol Biochem Parasitol.** 1993 Jun;59(2):327-9.
 49. Bialek R, Konrad F, Kern J, Aepinus C, Cecenas L, Gonzalez GM, et al. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and

- aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. **J Clin Pathol.** 2005 **Nov**;58(11):1180-4.
50. Ferreira AW, Moraes SL. Sorologia, Importância e Parâmetros. In: Ferreira AW, Moraes SL, editores. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes: correlações clínico-laboratoriais. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p. 3-11.
51. Hodiament CJ, Kager PA, Bart A, de Vries HJ, van Thiel PP, Leenstra T, et al. Species-directed therapy for leishmaniasis in returning travellers: a comprehensive guide. **PLoS Negl Trop Dis.**2014 **May** 1;8(5)
52. Lavergne RA, Iriart X, Martin-Blondel G, Chauvin P, Menard S, Fillaux J, et al. Contribution of molecular diagnosis to the management of cutaneous leishmaniasis in travellers. **Clin Microbiol Infect.** 2014 **Aug**;20(8):O528-30
53. Ranasinghe S, Wickremasinghe R, Hulangamuwa S, Sirimanna G, Opathella N, Maingon RD, et al. Polymerase chain reaction detection of Leishmania DNA in skin biopsy samples in Sri Lanka where the causative agent of cutaneous leishmaniasis is Leishmania donovani. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2015
54. Fagundes A, Schubach A, Paula CC, Bogio A, Antonio Lde F, Schiavoni PB, et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2010 **Feb**;105(1):109-12.
55. Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin JC, Van der Auwera G. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global Leishmania species identification. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2012 **Jul**;31(7):1453-61.
56. Silva JG, Silva TM, Peloso Ede F, Machado-Coelho GL, Mayrink W, Ariosa MC, et al. Comparison among three polymerase chain reaction assays on detection of DNA from Leishmania in biological samples from patients with American cutaneous leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2012 **Mar-Apr**;45(2):257-9.
57. Gomes CM, Mazin SC, Santos ER, Cesetti MV, Bächtold GA, Cordeiro JH, et al. Accuracy of mucocutaneous leishmaniasis diagnosis using polymerase chain reaction: systematic literature review and meta-analysis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2015 **Apr**;110(2):157-65.
58. Chicharro C, Alvar J. Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients. **Ann Trop Med Parasitol.** 2003 **Oct**;97 **Suppl 1**:75-8.

APÊNDICE A- PROCEDIMENTOS PARA COLETA DE MATERIAL PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

BIÓPSIA

1. Escolher o local para o exame, de preferência a lesão mais recente (mais ricas em parasitos) e com menos infecção secundária,
2. Lavar a lesão com água e sabão ou soro fisiológico,
3. Fazer assepsia ou limpar a região a ser feita a biópsia com gaze ou algodão embebido em álcool a 70%, trocando 3 a 4 vezes. Não usar álcool-iodado.
4. Procedimento de anestesia:
 - a. Para biópsias de lesão cutânea: Proceder a anestesia local com a injeção subcutânea de lidocaína a 1 ou 2%, sem adrenalina. Infiltrar cerca de 0,2 a 0,5 ml. Usar, preferencialmente, seringas do tipo tuberculina com agulhas removíveis, tendo cuidado de sempre trocar a agulha usada para aspirar o anestésico do frasco por uma nova agulha.
 - b. Para biópsias de lesão de mucosa nasal, usar anestésico tópico em SPRAY que deve ser aplicado 3 a 4 vezes com intervalo de 5 min.
5. Procedimento de biópsia:
 - a. Aguardar o tempo de ação do anestésico e proceder à biópsia utilizando "punch" de 4 ou 5 mm de diâmetro (pele de outras localizações), e de 2 mm de diâmetro em pele da face, e pinça storz em mucosa nasal.
 - b. Lesão cutânea: Movimentar o "punch" em rotação de meio círculo para a esquerda e a direita, alternadamente e quando se chegar à derme (a amostra começa a ser visualizada no espaço aberto do "punch"), a movimentação deve passar a ser feita com inclinação de 45º com o intuito de seccionar a base do cone da biópsia; se houver dificuldade de cortar a base com o "punch" ou bisturi, usar a tesoura, cortando por baixo, evitando-se o uso de pinça. A biópsia também pode ser feita com bisturi, se o "punch" não estiver disponível, mas nos dois procedimentos evitar o aprofundamento das lesões para não possibilitar a ampliação da lesão; realizar hemostasia compressiva por 1 a 5 min.
6. Fazer curativo compressivo com tampão de gaze e orientar a retirada do curativo após 24h (pele) ou até cessar o sangramento (região nasal).
7. Deixar o "punch" ou bisturi com a amostra, em placa de PETRI estéril, ou sobre uma superfície estéril.

8. Separar o fragmento de lesão do "punch" e seccioná-lo usando pinça de dissecação e bisturi esterilizados, no sentido epiderme-derme de modo a dividir o material para:
 - a. Preparo de lâmina por técnica de aposição (*imprint*),
 - b. Isolamento e cultivo e diagnóstico molecular,
 - c. Exames histopatológicos. O fragmento usado para preparo de lâminas (*imprint*) pode ser enviado para preparo de lâminas e realização deste exame.

PREPARO DE LÂMINA PARA A TÉCNICA DE IMPRINT

1. Lavar o fragmento de biópsia em solução salina estéril.
2. Realizar compressão delicada do fragmento de biópsia sobre lâmina(s) de vidro previamente limpa(s), desengordurada(s) e seca(s).
3. Encaminhar a lâmina para o laboratório em recipiente adequado e identificado. No laboratório as lâminas serão coradas com derivados do Romanowsky: Giemsa, Leishman ou corantes rápidos e observadas no microscópio óptico para pesquisa de formas amastigotas.

PREPARO DO MATERIAL PARA CULTURA *IN VITRO* DO PARASITA

1. Colocar os fragmentos de lesões em tubos plásticos estéreis contendo solução salina estéril acrescida de 50 µg de 5'fluorocitosina; 100U de penicilina e 100 µg de estreptomicina por mL.
2. Identificar as amostras e mantê-las a temperatura ambiente até serem encaminhadas ao laboratório no mesmo dia (em até 4 h).

Encaminhar a lâmina com *imprint* e o fragmento da lesão para isolamento e cultivo *in vitro* e PCR para:

Instituto de Medicina Tropical (IMT, USP)
Lab. de Soroepidemiologia, Imunobiologia e Biologia Molecular.
Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 470. Prédio II - 4º andar- Sala 7.
Responsáveis: Prof. Dr. Paulo C. Cotrim e Dr. José Ângelo L. Lindoso
A/C: Edite H. Kanashiro ou Mussya Cisotto.
Tel.: 3061-7024

APÊNDICE B- PROTOCOLO PARA ISOLAMENTO E CULTIVO *IN VITRO*

1. Os fragmentos de lesões são recebidos em tubos plásticos estéreis contendo solução salina estéril acrescida de 50 µg de 5'fluorocitosina; 100U de penicilina e 100 µg de estreptomicina por mL.
2. Identificar as amostras e mantê-las a temperatura ambiente até serem encaminhadas ao laboratório no mesmo dia.
3. Ao chegar ao laboratório, trocar a solução salina em ambiente estéril e deixar as amostras nessa condição por 4 horas a 4°C;
4. Após esse período, transferir assepticamente a amostra para a placa de Petri, dividi-la em pequenos fragmentos e inoculá-los em tubos separados contendo meio de cultura bifásico (NNN acrescido de meio Schneider ou LIT com 10% de soro fetal bovino – SFB), incubando-os a temperatura de 26–28°C em estufa biológica. Separar parte dos fragmentos para os procedimentos de biologia molecular.
5. Após o quinto dia, coletar pequenas alíquotas da fase líquida para exame a fresco, procurando evidenciar a presença de formas promastigotas. Repetir o exame a fresco em intervalos de sete dias durante 30 dias.

Obs.: Normalmente a positividade é dada até o 20º dia, no entanto, realiza-se mais um exame por volta do 30º dia antes do cultivo ser desprezado.

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

1. O fragmento tecidual deve ser fixado em formol neutro a 10% e encaminhado ao laboratório, onde será embebido em parafina e, com o auxílio de micrótomo rotativo são obtidos cortes semifinos. Os cortes teciduais são corados pela técnica de Hematoxilina & Eosina (HE) e observadas no microscópio óptico para a pesquisa de formas amastigotas.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

1. O fragmento de lesões separado em ambiente estéril durante os procedimentos para realização do isolamento e cultivo *in vitro* do parasito, será macerado e submetido à extração de DNA.
2. Após a extração e quantificação do DNA, realiza-se a PCR com marcadores moleculares de sequências específicas para a detecção de DNA do parasito.
3. O resultado é obtido pela visualização dos fragmentos de DNA amplificados e separados mediante eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio (LKB- Producter AB®, Bromma, Suécia).

BIBLIOGRAFIA:

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. 180 p. BRASIL. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

APÊNDICE C- APOSTILA PARA DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO E MOLECULAR DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO E MOLECULAR DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.

Material elaborado pela equipe do Lab. de Soroepidemiologia, Imunobiologia e Biologia Molecular, Instituto de Medicina Tropical (IMT, USP).
Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 470. Prédio II - 4º andar- Sala 7.
Responsáveis: Prof. Dr. Paulo C. Cotrim e Dr. José Ângelo L. Lindoso.

Fluxograma de trabalho

1) Recebimento das amostras.

- a. Ficha com dados do paciente
- b. Lâmina
- c. Fragmentos de lesão cutânea ou mucosa

2) Encaminhamento das amostras

- a. Caso suspeito de leishmaniose visceral e HC: 1° andar
- b. Caso suspeito de leishmaniose cutânea ou mucosa, ER: 4° andar.

3) Registros dos pacientes.

- a. Pedido de Exame
- b. Ficha com resultados de exames
- c. Relatório de bancada de PCR

4) Testes diagnósticos

- a. Pesquisa direta em lâmina
- b. Isolamento e cultivo *in vitro*
- c. Sorologia
- d. PCR

5) Diagnóstico Molecular

- a. Extração de DNA
 - Fragmento de lesão: maceração e digestão com proteinase K.
- b. Quantificação de DNA em Nanodrop.
 - Conferir quantidade e qualidade do DNA extraído.
- c. PCR β -globina:
 - i. β -globina +: Realizar *kDNA*-PCR
 - ii. β -globina - : Repetir extração de DNA
- d. *kDNA*-PCR
 - i. PCR +: Presença de leishmânia
 - ii. PCR -: Suspeita de leishmaniose descartada.
- e. Análise dos dados: comparação com resultados de outros testes diagnósticos.
 - a. Resultado compatível com o dos exames parasitológicos: ok
 - b. PCR + e parasitológico - : Repetir a reação de PCR
 - c. PCR - e parasitológico +:
 - i. Repetir a reação de PCR.
 - ii. Repetir extração de DNA

6) Registro de resultados em caderno e no banco de dados.

7) Emissão de Laudo.



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Laboratório de Soroepidemiologia, Imunologia e Biologia Molecular. LIM48.

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 500- 4º Andar sala07. CEP05403-000- São Paulo-
Brasil.

Telefone: (11) 3061-7024

Código Interno: _____ Data de recebimento ____/____/20____

Nome do paciente: _____

Emílio Ribas Hospital das Clínicas Outros _____

No. Identificação/ Registro: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Sexo: M F

Diagnóstico provável: L. visceral L. cutânea L. mucosa

Médico Responsável: _____ Local provável de infecção: _____

Material recebido:

Lâmina Fragmento de Lesão Mielo Sangue Bloco parafinado

Exames solicitados:

Pesquisa Direta

Responsável: _____ Resultado: _____/____/____

Obs.: _____

Isolamento e Cultivo *in vitro*

Responsável: _____ Meio de cultura: _____

1º leitura: ____/____/____ Res: _____ 2º leitura: ____/____/____ Res: _____

3º leitura: ____/____/____ Res: _____ 4º leitura: ____/____/____ Res: _____

Obs.: _____

PCR

Kit Extração: _____ Responsável: _____/____/____

Proteinase K: ____h incubação. DNA: caixa____ dosagem: ____ng/ µL. OD (260/280): _____

Obs.: _____

β-globina-PCR: _____ Responsável: _____/____/____ Registro: _____

Obs.: _____

kDNA-PCR: _____ Responsável: _____/____/____ Registro: _____

Obs.: _____

ELISA Responsável: _____ Resultado: _____/____/____

IFI Responsável: _____ Resultado: _____/____/____

Resultado final: _____ Conferido por: _____

Versão impressa entregue a _____/____/____

EXTRAÇÃO DE DNA DE LESÕES (WIZARD GENOMIC DNA PURIFICATION KIT PROMEGA)

FRAGMENTAÇÃO DO TECIDO COM PROTEÍNASE K

- 1) Adicionar 120 μL de EDTA 0,5M pH 8,0 à 500 μL de “Nuclei Lysis Solution” em microtubo e resfriar a amostra.
- 2) Adicionar 10 – 20 mg de tecido em outro microtubo e macerar o tecido
- 3) Adicionar 600 μL da mistura EDTA/ “Nuclei Lysis Solution” ao microtubo.
- 4) Adicionar 17,5 μL de Proteinase K (20mg/mL)
- 5) Incubar o microtubo por 16 h à 55°C com agitação suave ou por 3 h agitando o microtubo em *vortex* uma vez por hora.

LISE E PRECIPITAÇÃO PROTEICA

- 6) Adicionar ao microtubo 3,0 μL de “RNase SOLUTION”.
- 7) Misturar por inversão do tubo 2-5 vezes.
- 8) Incubar a solução à 37°C por 30 min.
- 9) Resfriar até a temperatura ambiente (por volta de 5 min.)
- 10) Adicionar ao microtubo 200 μL de “PROTEIN PRECIPITATION SOLUTION”
- 11) Agitar a amostra em *vortex* por 20 segundos.
- 12) Deixar o microtubo resfriar no gelo por 5 min.
- 13) Centrifugar a 13.000 – 16.000 x g. por 4 min.

PRECIPITAÇÃO DO DNA E RE-HIDRATAÇÃO DO *PELLET* DE DNA

- 14) Transferir o sobrenadante para um novo microtubo contendo 600 μL de isopropanol a temperatura ambiente.
- 15) Misturar a solução delicadamente por inversão do tubo até o aparecimento de uma massa visível de DNA.
- 16) Centrifugar a 13.000 – 16.000 x g por 1 minuto.
- 17) Descartar o sobrenadante.
- 18) Adicionar ao microtubo 600 μL de etanol 70% a temperatura ambiente. Inverter o microtubo várias vezes para lavar o DNA.
- 19) Centrifugar a 13.000- 16.000 x g por 1 minuto.
- 20) Aspirar o etanol cuidadosamente.
- 21) Inverter o microtubo em um papel absorvente limpo e deixar o precipitado secar por 15 min.
- 22) Rehidratar o DNA em 100 μL de “DNA REHYDRATION SOLUTION” por 1 hora a 65 °C ou de um dia para o outro a 4°C.
- 23) Armazenar a amostra de DNA em temperatura de -20°C.

EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE SANGUE TOTAL

LISE DOS ERITRÓCITOS

- 1) Coletar o sangue em um tubo com EDTA.
- 2) Adicionar 300 μL de sangue a um microtubo de 1,5 mL.
- 3) Adicionar 900 μL de “RBC Lysis Buffer” e misturar a solução por inversão. Não agitar no *vortex*.
- 4) Incubar o microtubo por 5 min. a temperatura ambiente.
- 5) Centrifugar a 800 x *g* por 2 min. e descartar o sobrenadante.
- 6) Adicionar ao microtubo 100 μL de “RBC Lysis Buffer” e ressuspender o precipitado.

LISE CELULAR

- 7) Adicionar ao microtubo 200 μL de “GB Buffer” e misturar com o *vortex*.
- 8) Incubar a solução a temperatura ambiente por 10 min. até o lisado celular ficar claro. Inverter o microtubo a cada 3 min.
- 9) Em outro microtubo de 1,5 mL aquecer o tampão “Elution buffer” (50 μL por amostra) em banho-maria a 70°C.

=> Opcional: Adicionar 2 μL de RNase (50 mg/mL) ao lisado celular, agitar no *vortex* e incubar a temperatura ambiente por 5 min.

LIGAÇÃO DO DNA

- 10) Adicionar 200 μL de etanol (96 - 100%) ao lisado e agitar no *vortex* por 10 segundos. Se um precipitado for visualizado, rompê-lo com o auxílio da micropipeta.
- 11) Colocar a coluna GD em um tubo de coleta de 2 mL.
- 12) Transferir todo o volume para a coluna, inclusive algum precipitado existente.
- 13) Tampar a coluna e centrifugá-la a 15.700 x *g* por 5 min.

LAVAGEM

- 14) Adicionar à coluna 400 μL do tampão “W1 Buffer”.
- 15) Centrifugar a 15.700 x *g* por 30 segundos.
- 16) Descartar o filtrado e recolocar a coluna no tubo coletor.
- 17) Adicionar 600 μL de tampão “Wash buffer” (com etanol) à coluna.
- 18) Centrifugar a 15.700 x *g* por 30 segundos.
- 19) Descartar o filtrado e recolocar a coluna no tubo coletor.
- 20) Centrifugar a 15.700 x *g* por 3 min. para secar o filtro da coluna.

ELUIÇÃO DO DNA

- 21) Transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL limpo.
- 22) Adicionar à coluna 50 μL de tampão “Elution buffer” pré-aquecido.
- 23) Deixar por 5 min. a temperatura ambiente até o tampão ser absorvido pelo filtro.
- 24) Centrifugar a 15.700 x *g* por 30 segundos para eluir o DNA.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:

(Genomic DNA Extraction kit [mini]- Real Genomics, 2007.

EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS DE SANGUE CONGELADAS

LISE CELULAR

- 1) Colocar 20 μL de Proteinase K (10 mg/mL) em um microtubo de 1,5 mL.
- 2) Adicionar 200 μL de sangue e misturar brevemente.
- 3) Incubar a temperatura ambiente por 10 min.
- 4) Adicionar 200 μL de "GB Buffer" ao microtubo e agitar em *vortex*.
- 5) Incubar a solução a 70°C por 10 min. até o lisado celular ficar claro. Inverter o microtubo a cada 3 min.
- 6) Em outro microtubo de 1,5 mL aquecer o tampão "Elution buffer" (50 μL por amostra) em banho-maria a 70°C.

=> Opcional: Adicionar 2,0 μL de RNase (50 mg/mL) ao lisado, agitar no *vortex* e incubar a temperatura ambiente por 5 min.

LIGAÇÃO DO DNA.

- 7) Adicionar 200 μL de etanol (96 - 100%) ao lisado e agitar no *vortex* por 10 segundos. Se aparecer um precipitado, rompê-lo com o auxílio da micropipeta.
- 8) Colocar a coluna GD em um tubo de coleta de 2 mL.
- 9) Adicionar toda a mistura, inclusive algum precipitado existente, na coluna.
- 10) Tampar a coluna e centrifugar a 15700 x g por 5 min.

LAVAGEM.

- 11) Adicionar 400 μL do "W1 Buffer" à coluna.
- 12) Centrifugar a 15700 x g por 30 segundos.
- 13) Descartar o filtrado e recolocar a coluna no tubo coletor.
- 14) Adicionar 600 μL de "Wash buffer" (com etanol) na coluna.
- 15) Centrifugar a 15700 x g por 30 segundos.
- 16) Descartar o filtrado e recolocar a coluna no tubo coletor.
- 17) Centrifugar a 15700 x g por 3 min. para secar o filtro da coluna.

ELUIÇÃO DO DNA

- 18) Transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL limpo.
- 19) Adicionar 50 μL de "Elution buffer" pré-aquecido à coluna.
- 20) Deixar por 5 min. a temperatura ambiente até o tampão ser absorvido pelo filtro.
- 21) Centrifugar a 15700 x g por 30 segundos para eluir o DNA.

EXTRAÇÃO DE DNA DE FRAGMENTOS DE LESÃO (QIAMP®DNA MINI KIT).

- 1)** Adicionar 180 µL de “Buffer ATL” ao microtubo plástico contendo 25 mg o fragmento de lesão macerado (ou 10 mg de vísceras). Agitar em *vortex*.
- 2)** Adicionar 20 µL de solução de Proteinase K (20mg/mL), homogenizar em *vortex* por 15 segundos.
- 3)** Incubar o microtubo a 56 °C por 24 h em banho seco até lise total do fragmento de tecido. Periodicamente, agitar a amostra em *vortex* e centrifugar rapidamente.
- 4)** Adicionar ao microtubo 4 µL de RNase (100 mg/mL), agitar em *vortex* por 15 segundos e incubar por 2 minutos a temperatura ambiente
- 5)** Adicionar ao tubo 200 µL do “Buffer AL” e misturar.
- 6)** Incubar a 70°C por 10 minutos.
- 7)** Adicionar ao tubo 200 µL de etanol (96-100%) e agitar em *vortex* por 15 segundos.
- 8)** Pipetar a solução na coluna e centrifugar a 8000 x g por 1 minuto.
- 9)** Após a centrifugação, desprezar a solução filtrada.
- 10)** Adicionar 500 µL de “Buffer AW1” à coluna e centrifugar a 8000 x g por 1 minuto.
- 11)** Desprezar a solução filtrada.
- 12)** Adicionar 500 µL do “Buffer AW2” à coluna e centrifugar a 14000 x g por 3 minutos.
- 13)** Desprezar a solução filtrada.
- 14)** Colocar a coluna em um microtubo plástico limpo de 1,5 ml.
- 15)** Adicionar 50 µL de “Buffer AE” (tampão de eluição).
- 16)** Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
- 17)** Centrifugar a 8000 x g por 1 minuto.

- 18)** Identificar a amostra de DNA e armazenar a -20°C.

QUANTIFICAÇÃO DE DNA- NANODROP

- 1) Usar luvas descartáveis sem talco.
- 2) Separar as amostras de DNA.
- 3) Incubar as amostras em termobloco a 65°C por 30 min.
- 4) Separar uma pipeta p10, ponteiros com filtro, lenço de papel, frasco para descarte de ponteiros, água, tampão de eluição, e um *pendrive*
- 5) Ligar o computador e entrar no software “ND-1000”
- 6) Selecionar a opção “Nucleic acid”.
- 7) Levantar “o braço” do equipamento.
- 8) Aplicar 2 uL de água ultrapura no pedestal. Baixar o braço e pressionar OK.
- 9) Pipetar 2 µL de tampão de eluição (TE)* no pedestal. O TE deve ser o mesmo que foi utilizado na extração da sua amostra.
- 10) Abaixar o braço e pressionar o botão “BLANK”.
- 11) Quando a leitura terminar, abrir o pedestal e secá-lo com um lenço de papel na parte superior e inferior do “braço”.
- 12) Certificar-se que esteja selecionada a opção “SAMPLE TYPE” e “DNA 50”.
- 13) Nomear a amostra no campo “Sample ID”.
- 14) Homogenizar a amostra.
- 15) Centrifugar rapidamente a amostra de DNA.
- 16) Pipetar 2,0 µL de amostra no pedestal.
- 17) Fechar o “braço” do leitor.
- 18) Selecionar a opção “MEASURE”.
- 19) Após a leitura secar o pedestal e a parte inferior do “braço”.
- 20) Repetir o procedimento dos itens 13-19 para cada uma das amostras.
- 21) Quando terminar a leitura das amostras, fazer a leitura de tampão de amostra e depois a leitura de uma amostra de água ultrapura.
- 22) Apertar o botão “SHOW REPORT”.
- 23) Uma nova janela se abrirá.
- 24) Selecionar a opção “REPORTS” -> “SAVE REPORT” -> “EXPORT REPORT TABLE ONLY”
- 25) Salvar o arquivo em um *pendrive*.
- 26) Abrir o arquivo usando o *software* Excel para obter uma tabela com os dados.

PCR

- 1) Planejar seu experimento: número de amostras a serem testadas, o volume total do *mix* a ser preparado, se a mesma amostra será testada em diferentes concentrações, programa de amplificação, número de poços disponível no gel de agarose/poliacrilamida.
 - a. Utilizar os formulários prontos para facilitar o planejamento.
 - b. O *mix* deverá ser preparado para n amostras mais uma ($n+1$).
 - c. Sempre incluir: a) o controle negativo (amostra sem DNA) que indicará que os reagentes do *mix* não estão contaminados; b) o controle positivo para provar que a reação funcionou; c) se o estudo for para identificação de espécies adicionar amostras de DNA de espécies conhecidas.

Preparo do *mix* (sala de reagentes)

- 2) Vestir o avental descartável da sala, manipular tudo com luvas descartáveis sem talco. Cabelos sempre presos.
- 3) Separar os materiais necessários:
 - a. 1 kit de micropipetas exclusivas para a preparação de *mix*,
 - b. Micropipeta exclusiva para adição de DNA.
 - c. Micropipeta p10 exclusiva para aplicação dos produtos de amplificação no gel.
 - d. Ponteiras com filtro autoclavadas,
 - e. Microtubos plásticos autoclavados (0,2 e 0,5 mL),
 - f. Descarte de pipetas,
 - g. Estante para tubos com gelo ou *cooler*,
 - h. Caneta permanente,
 - i. Caixa de isopor com gelo triturado ou 2 *coolers*: 1 para tubos de 0,2 mL e outro para tubos de 2,0 mL,
 - j. Reagentes para a reação: tampão para PCR 10x, MgCl₂, dNTPS, Taq polimerase, primer-F, primer- R, água de injeção. *Sempre utilizar as soluções em alíquotas diluídas na concentração de uso, conferir o volume e concentração de uso para não faltar. Não utilizar soluções-mãe. MANTER EM GELO!*
- 4) Limpar bem a bancada ou fluxo laminar com álcool 70% e água oxigenada ou solução de DNase. Se tiver U.V, deixá-la ligada por 15 min. com todo o material, exceto os reagentes.
- 5) Anotar seu nome no caderno de usuários da *workstation*.
- 6) Após o tempo estabelecido, desligar a U.V. inserir o *cooler* com os reagentes.

PREPARO DO MIX.

- 7) Ordenar os reagentes segundo o protocolo.
- 8) Anotar no formulário qual o número das alíquotas dos reagentes.
- 9) Separar: 1 tubo de 0,5 mL para o *mix* (identificá-lo), tubos de 0,2 mL para as amostras de DNA, deixando-as nos *coolers*.
- 10) Descongelar as alíquotas dos reagentes em caixa com gelo.
- 11) Homogenizar as soluções no *vortex* e realizar uma centrifugação rápida (*spin*).
- 12) Acrescentar os reagentes segundo a ordem estipulada no protocolo.
Utilizar sempre micropipetas com volume próximo ao desejado.
- 13) Se preferir, após adição de cada reagente colocá-lo em um canto distinto na caixa de gelo ou marcar no papel qual já foi acrescentado.
- 14) Descartar a ponteira sempre que dispensar um reagente no tubo do *mix*.

- 15) Após a adição do último reagente, homogenizar o *mix* e realizar um *spin*.
- 16) Numerar os microtubos de PCR com o número da reação.
- 17) Distribuir o *mix* nos microtubos de 0,2 mL.
- 18) Acrescentar o volume de água correspondente ao de DNA no tubo do controle negativo. *Descartar o restante da alíquota de água para evitar contaminações.*
- 19) Tampar os microtubos de 0,2 mL e deixá-los em ordem numérica no *cooler*.
- 20) Limpar a *workstation* com álcool 70%.
- 21) Ajustar as micropipetas para o volume máximo.
- 22) Guardar os reagentes e iniciadores no freezer.
- 23) Seguir para a sala de amostras levando apenas o *cooler* com os microtubos.

ADIÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS: SALA DE AMOSTRAS.

- 24) Limpar a bancada com álcool 70% e água oxigenada.
- 25) Selecionar as amostras de DNA que serão utilizadas e deixá-las descongelando em uma estante.
- 26) Ordenar as amostras segundo a ordem do formulário.
- 27) Homogenizar a amostra de DNA. Centrifugá-las rapidamente (*spin*).
- 28) Adicionar as amostras de DNA aos microtubos de PCR com o número correspondente.
 - a. *Utilizar o abridor (opener) para evitar contaminação por aerossóis.*
 - b. *Descartar a ponteira após aplicação de cada amostra.*
 - c. *Limpar o abridor de microtubos com uma gaze com álcool 70% todas as vezes que abrir um microtubo.*
- 29) Após a adição de DNA de todas as amostras, centrifugar rapidamente os microtubos e devolvê-los ao *cooler*.
- 30) Ajustar a micropipeta no volume máximo. Limpar a bancada e o abridor de microtubos com álcool 70%.
- 31) Guardar as amostras de DNA no freezer específico para armazenamento de amostras de DNA.
- 32) Seguir para a sala de amplificação levando o *cooler* com os microtubos de PCR.

SALA DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA

- 33) Ligar o termociclador.
- 34) Configurar ou verificar o programa de amplificação desejado.
- 35) Colocar os tubos no termociclador.
- 36) Anotar seu nome no caderno específico para o uso do aparelho com o horário do começo e término do programa.
 - a. *Se não puder retirar as amostras quando acabar, configurar o programa para manter os microtubos a 4 °C.*
- 37) Quando a reação de amplificação terminar, desligar o termociclador e guardar as amostras na geladeira específica para *amplicons* até a realização da eletroforese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Fermentas, Protocol for PCR using Taq polymerase.
- Volpini, A.C. et al., 2004. PCR- RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 90, 31-37.

PCR Beta-globina

Iniciadores:

HβG-F 5'GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3'

HβG-R 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'

Beta-globina mix

Reagentes/ N° reações	1x		N+1
H ₂ O	31,55	μL	
Taq Buffer 10x	5,0	μL	
MgCl ₂ (25mM)	3,0	μL	
dNTP mix (10 mM)	1,0	μL	
HβG-F (10 μM)	2,5	μL	
HβG-R (10 μM)	2,5	μL	
Taq (5U/μL)	0,2	μL	
DMSO	1,25		
Total	47,0		
DNA	3,00	μL	

Beta-globina Programa:

Etapa	35 ciclos				
	Desn.	Desn.	Anel.	Ext.	Ext.
Temp. °C	95	95	53	72	72
Tempo	2 min	20 s	30 s	1 min	6 min

Eletrforese

Eletrforese em gel de agarose 2%, 80V, 40 min.

Produto amplificado: 268 pb

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Al- Jawabreh, et al. (2004) The recent emergence of *Leishmania tropica* in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of *L. major*. **Tropical Medicine and International Health** v.9 n.7 pp 812-816.

Formulário de PCR:

Data:

Iniciadores: H β G-F, H β G-R

Programa:

95°C - 2 min

35 ciclos:

Den. 95°C - 20 s

An.: 53 °C - 30 s

Pol.: 72 °C - 1 min

72 °C - 6 min

Equipamento:

Realizado por:

N°	SAMPLE	Res.
	Branco	

Aliq.	Mix	1	x	n
	Água ultra pura	15,77	μ L	
	Tampão de PCR	2,50	μ L	
	MgCl ₂ (25mM)	1,50	μ L	
	dNTP mix (10mM)	0,50	μ L	
	HbG R (10 μ M)	1,25	μ L	
	HbG F (10 μ M)	1,25	μ L	
	Taq pol. (5U/ μ L)	0,10	μ L	
	DMSO	0,60		
		23,5	μ L	
	DNA 100ng/UI	1,5	μ L	

PCR -

___/___/___ - Eletroforese em gel de agarose 2%, 80V, 40 min.

Produto amplificado: 268 pb

Coloração com brometo de etídio

PCR- *kDNA*

Iniciadores:

kDNA 20: 5' GGG KAG GGG CGT TCT SCG AA 3'

kDNA 22: 5' SSS WCT ATW TTA CAC CAA CCC C 3'

kDNA mix

Reagentes/ N° de reações	1x		N+1
H ₂ O	11,10	μL	
Taq Buffer 10x	2,00	μL	
MgCl ₂ (25mM)	0,80	μL	
dNTP mix (10 mM)	0,40	μL	
<i>kDNA</i> 22 (10 μM)	0,75	μL	
<i>kDNA</i> 20 (10 μM)	0,75	μL	
Taq (5U/μL)	0,20	μL	
Total	16,0		
DNA	4,00	μL	

kDNA – Programa de amplificação

Etapa	35 ciclos				
	Desn.	Desn.	Anel.	Ext.	Ext.
Temperatura °C	94	94	58	72	72
Tempo	4 min.	1 min.	1 min.	30 s.	5 min.

Eletroforese

Verificar o produto de amplificação de 125 pb do PCR-*kDNA* por eletroforese em gel de agarose a 2%, 80V, 40 min. ou gel de poliacrilamida a 6%, 90V- 5 min.; 110V 30 min. Marcador de peso molecular de 100 pb.

Gel de agarose a 2%

	50 mL	100 mL
Agarose	1,0 g	2,0 g
TAE 1x	50 mL	100mL

Gel de poliacrilamida

Concentração	6%		10%	
	1 Gel	2 géis	1 Gel	2 géis
Sol. acrilamida 30%	2,00 mL	4,00mL	3,33 mL	6,66 mL
Tris 1M pH 8,8	3,73 mL	7,46 mL	3,73 mL	7,46 mL
SDS 10%	100 μL	200 μL	100 μL	200 μL
H ₂ O	4,16 mL	8,32 mL	2,83 mL	5,66 mL
APS 10%	50 μL	100 μL	50 μL	100 μL
TEMED	10 μL	20 μL	10 μL	20 μL

Formulário de PCR:

Data:

Iniciadores: ***kDNA-20, kDNA-22***

Programa:

94°C - 4 min

35 ciclos:

Den. 94°C - 1 min.

An.: 58 °C – 1 min.

Pol.: 72 °C – 1 min

72 °C – 5 min

Realizado por:

N°	SAMPLE	Res.
	Branco	

Aliq.	Mix	1 x	n
	Água ultra pura	11,10	µL
	Tampão de PCR 10X	2,00	µL
	MgCl ₂ (25mM)	0,80	µL
	dNTP mix (10mM)	0,40	µL
	KDNA 20 (10µM)	0,75	µL
	KDNA 22 (10µM)	0,75	µL
	Taq pol. (5U/µL)	0,20	µL
		16,0	µL
	DNA 50 ng/µl	4	µl

PCR –

___/___/___ Gel de agarose 2%, 80V, 40 min.

Coloração Brometo de etídio

Produto de amplificação: 125pb.

PCR-RFLP para identificação de espécies *L. (V.) braziliensis*

- 1) Realizar a reação de PCR com os iniciadores *kDNA* 20 e *kDNA* 22. Incluir uma amostra controle de *Leishmania (L.) amazonensis* e uma de *Leishmania (V.) braziliensis*.
- 2) Analisar os fragmentos obtidos após eletroforese em gel de agarose a 2%.
- 3) Separar os produtos positivos de PCR- *kDNA* das amostras em estudo.
- 4) Para realizar a digestão do produto de amplificação, utilizamos dois kits com protocolos diferentes:
- 5) Seguir o protocolo recomendado pelo fabricante (neste protocolo, ambas as enzimas são da Fermentas®).

Reagentes	Fast digest	Normal
Água	8,5 µL	5 µL
Tampão 10x	1,0 µL	3 µL
Produto PCR	5,0 µL	5,0 µL
<i>Hae III</i>	0,5 µL	2 µL
Total	15,0 µL	15 µL
Incubação	37 °C, 5 min.	37°C, 1-16h

- 6) Após a incubação, analisar os fragmentos obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, 60V, 2h e 30 min. e padrão de peso molecular “*ultra low range ladder*” (Fermentas®) ou que determine: 125 pb, 80 pb, 45 pb. O volume do produto de digestão a ser colocado no gel deve ser equivalente ao triplo do volume do produto de PCR analisado anteriormente na eletroforese. Por exemplo:

Após a PCR-*kDNA* foi realizada uma eletroforese utilizando 3 µL de produto de PCR. Na eletroforese para análise do produto de digestão deveremos colocar 9 µL de produto de digestão. A seguir, o mesmo volume do tampão de amostra será adicionado.

- 7) Resultado: Se fragmento de 125 pb obtido pela PCR for digerido em 2 fragmentos de 80 e 45 pb, então a amostra é *L. (V.) brasiliensis*. Se não houver digestão, trata-se de outra espécie.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:

- FastDigest *Hae III (BsuRI)* Fermentas®.
- Volpini, A.C. et al., 2004. PCR- RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. Acta Tropica 90, 31-37.
- *BsuRI (HaeIII)* #ER0151 Fermentas®.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 2%

- 1) Verificar quantas amostras você possui. O gel adequado deverá ter o número de amostras mais 1 poço para o padrão de peso molecular pelo menos.
- 2) Escolher a forma do gel e o/os pentes necessários.
- 3) Fazer duas “barreiras” nas extremidades da forma com fita adesiva. *Certificar-se que ambos estão bem vedados para que o gel não vaze.*
- 4) Pesar a agarose em um erlenmeyer de 250 mL (2,0 g para a cuba média, 1,0 g para a cuba pequena).
- 5) Adicionar o tampão TAE 1x ou TBE 1x ao frasco. (50 mL para cuba pequena e 100 mL para média). Para obter o TAE 1x, diluir 20 mL de TAE 50X e completar o volume para 1,0 L com água destilada.
- 6) Aquecer a solução no forno de microondas até a fervura.
- 7) Desligar o microondas e homogenizar a solução. Cuidado com o vapor!
- 8) Repetir os passos 6 e 7 até a completa dissolução da agarose. *A solução deve ficar transparente e sem grumos nas paredes dos frascos.*
- 9) Esfriar a solução até 55 - 60°C, agitando-a sempre, colocando o frasco sob a água corrente ou com o auxílio de um agitador magnético.
- 10) Verter a solução na forma, homogenizar a solução de vez em quando para esta não solidificar ou apresentar diferentes concentrações de agarose no gel.
- 11) Retirar as bolhas e colocar o(s) pente(s).
- 12) Deixar o gel solidificar.
- 13) Quando a agarose tiver solidificado, retirar a fita adesiva e colocar o molde contendo o gel na cuba. A corrente elétrica corre no sentido do polo negativo (preto) para o positivo (vermelho), então a parte do gel com os pocinhos deverá estar “mais próxima” do polo negativo (preto).
- 14) Preencher a cuba com tampão de corrida (TAE ou TBE 1x, o mesmo usado para preparar o gel, até cobrir o gel com uma fina camada de tampão).
- 15) Retirar o(s) pente(s). *Retirar eventuais bolhas dos pocinhos.*
- 16) Preparar as amostras e o padrão de peso molecular. (Amostras: 5 µL de amostras e 1 µL de tampão de amostra (Loading dye 6x) (Fermentas®). Padrão de peso molecular (Fermentas®): 1 µL de tampão de amostra, 1 µL de ladder, 4 µL de H₂O ultra pura). Não se esqueça de anotar a posição das amostras no gel.

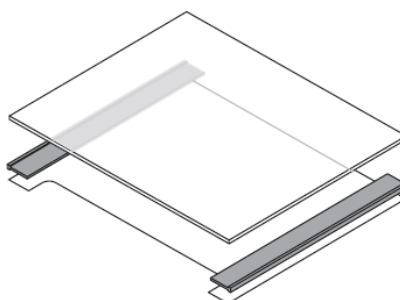
- 17) Fechar a cuba, conectar os cabos à fonte e correr o gel. A extensão da corrida e a voltagem dependerão dos propósitos do estudo.
- 18) Terminada a corrida, transferir o gel sem a forma para a solução de brometo de etídio (LKB- Producter AB®, Bromma, Suécia) contida num pote plástico. Corar por 15 min. (*Solução de brometo de etídio (LKB- Producter AB®, Bromma, Suécia): TAE ou TBE 1x, pode ser até reaproveitado da cuba, e 20 µL de solução de brometo de etídio (LKB- Producter AB®, Bromma, Suécia)). Esta solução é mutagênica e carcinogênica, então, usar luvas e espátulas exclusivas para tal fim e evitar inalá-la. Caso esta esteja com atividade reduzida acrescente mais brometo de etídio (LKB- Producter AB®, Bromma, Suécia) ou descarte-a no frasco específico contendo carvão ativado.*
- 19) Transferir o gel com o auxílio de espátulas para o transiluminador (*Utilize óculos especiais e o cone para visualizar o gel na luz ultravioleta*).
- 20) Se o gel estiver “cor-de-rosa”, há excesso de brometo. Deixe-o de molho por 15 min. em água destilada (solução descorante).
- 21) Fotografar o gel.
- 22) Descartar o gel no *descarpack* laranja.
- 23) Retirar o excesso de brometo do transiluminador com uma gaze.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:

- Molecular cloning. A laboratory manual (Sambrook, J., Martiat, T., 2nd edition, 1989)

Gel de Poliacrilamida

- 1) Lavar as placas de vidro (uma maior e uma menor), espaçadores e pentes com SDS 10%, enxaguar com água corrente, álcool 70% e água destilada. Secar com gaze.
 - a. *Para a cuba da Hoefer em vez de se usar a placa de vidro menor, deve-se usar a placa com abas nas laterais.*
 - b. *Verificar se os pentes e espaçadores são de mesma espessura.*
- 2) Colocar os espaçadores entre as placas de vidro. Posicionar os espaçadores nas laterais das placas (um de cada lado). Esta configuração é denominada “sanduíche”.

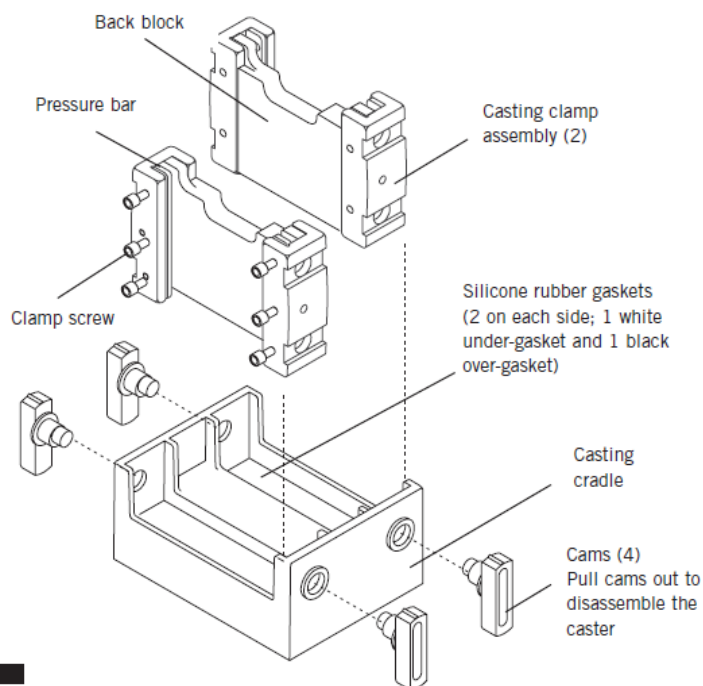


- 3) Colocar o “sanduíche” no “CASTING CLAMP” com o vidro maior em contato com o fundo de acrílico. Nivelar as duas placas e ajustar os parafusos até que o “sanduíche” fique preso.
- 4) Acoplar o “CASTING CLAMP” na base de montagem do gel com o vidro menor voltado para o exterior.
- 5) No equipamento da Hoffer, acoplar as peças laterais e girar 180° para fixar o “CASTING CLAMP” à base.
- 6) Verificar se o “sanduíche” está bem montado, adicionando água entre as placas. Se não vazar, está montado corretamente. Retirar a água com papel filtro.
- 7) Preparar a solução de poliacrilamida:

Concentração	6%		10%		12%	
Reagentes	1 Gel	2 géis	1 Gel	2 géis	1 Gel	2 géis
Sol. Acrilamida 30%	2,00 mL	4,00mL	3,33 mL	6,66 mL	4,00 mL	8,00 mL
Tris 1M pH 8,8	3,73 mL	7,46 mL	3,73 mL	7,46 mL	3,73 mL	7,46 mL
SDS 10%	100 µL	200 µL	100 µL	200 µL	100 µL	200 µL
H ₂ O	4,16 mL	8,32 mL	2,83 mL	5,66 mL	2,16 mL	5,32 mL
APS 10%	50 µL	100 µL	50 µL	100 µL	50 µL	100 µL
TEMED	10 µL	20 µL	10 µL	20 µL	10 µL	20 µL

Obs: Adicionar o APS e o TEMED apenas na hora de verter o gel.

a) O APS deve ser preparado na hora do uso. A solução de APS pode ser utilizada novamente se for congelada (usar apenas 2 vezes após o preparo). Se preferir, pesar 10 mg de APS e armazenar em microtubos plásticos. Na hora de preparar o gel adicionar 100 µL de água ao microtubo.



- 8)** Verter o gel logo após adicionar o APS e TEMED. Retirar eventuais bolhas e encaixar o pente. *A solução de poliacrilamida preparada há muito tempo precisa de mais tempo para polimerizar. Se houver muitas bolhas entre o gel e o pente, retirar o pente e remover as bolhas adicionando mais solução e retirar as bolhas por pipetagem.*
- 9)** Deixar o gel polimerizar no escuro.
- Atenção: O gel pode encolher ao polimerizar, então, após 10 min. Que o pente for colocado, verificar se os poços estão bem definidos ou se é necessário adicionar mais gel.
 - Se for utilizá-lo no dia seguinte, mantenha-o na base, a 4°C coberto com papel alumínio.*
- 10)** Retirar o sanduíche da base de montagem do gel.
- 11)** Montagem da cuba vertical:
- Cuba Bio-Rad: retirar o "CASTING CLAMP" da base e encaixá-la na peça intermediária.
 - Cuba Hoeffler: retirar o sanduíche do "CASTING CLAMP", e colocá-lo no suporte da cuba, fixando com as presilhas vermelhas.
Se for correr apenas um gel, não se esqueça de encaixar uma placa de vidro do outro lado do suporte.
- 12)** Colocar tampão na cuba até cobrir os fios da parte de baixo do suporte e no compartimento atrás da placa onde está o gel até cobrir a placa menor.
- Se o gel foi preparado no dia anterior deixe-o montado na cuba, imerso no tampão por 30 min. para rehidratá-lo.*
 - Se for correr apenas um gel, colocar tampão apenas no lado onde estiver o gel.*

- 13)** Marcar no vidro a posição dos pocinhos com uma caneta permanente.
- 14)** Quando o gel rehidratar, retirar o pente cuidadosamente e lavar a superfície dos pocinhos com tampão usando uma seringa e agulha para retirar bolhas e resíduos de gel.
- 15)** Preparar as amostras e o padrão de peso molecular: em um microtubo adicionar 5 μL de produto de PCR e 1 μL de tampão de amostra. Incubar por 5 min. à 60°C, se necessário. Ladder: 1 μL Tampão de amostra, 1 μL Ladder, 4 μL H_2O . *Leia a bula do tampão de amostra, algumas não devem ser aquecidas e o volume total pode variar.*
- 16)** Aplicar as amostras no gel.
- 17)** Aplicar a voltagem adequada ao gel até que o marcador (tampão de corrida) atinja a base do gel. Se os fragmentos de interesse forem pequenos, diminuir a voltagem aplicada.
- 18)** Após a corrida, correr o gel com brometo de etídio (LKB- Producter AB®, Bromma, Suécia) ou coloração em prata.
- Filtrar o tampão e guardá-lo na geladeira, reutilizando-o até 2x.

SOLUÇÕES DE USO

A. Acrilamida-bis-acrilamida

Acrilamida 30% (p/v)	30,0 g
Bis-acrilamida 0,8% (p/v)	0,8 g
H_2O bi-destilada	q.s.p 100 mL

Manusear a acrilamida e bis-acrilamida em cabine de proteção com uso de luvas e máscara, pois estes reagentes são neurotóxicos e absorvíveis pela pele. Dissolver com agitador magnético por 20 min. Filtrar em papel filtro *Whatman 42*. Guardar em frasco escuro a 4°C.

B. Tampão tris- HCl 1M pH 8,8

Tris	60,57 g
H_2O bi-destilada q.s.p	500 mL
HCl 6N	q.s.p. pH 8,8

Dissolver o Tris em 480 mL de H_2O bi-destilada em banho-maria a 56°C se necessário. Ajustar o pH com HCl 6N e completar o volume. Guardar em frasco escuro a 4°C.

C. Dodecil sulfato de sódio 10% (SDS)

SDS	10 g
H_2O bi-destilada	q.s.p 100 mL

Dissolver em banho-maria a 56°C. Não agitar. Guardar a temperatura ambiente. *SDS é tóxico e irritante, risco severo aos olhos. Não inalar, usar luvas.*

D. Persulfato de amônio 10% (APS)

APS	30 mg
H ₂ O bi-destilada	q.s.p 0,3 mL

Preparar no momento do uso ou congelá-lo.

E. TEMED (Tetramethylethylenediamine)

Manter a 4°C.

F. Tampão de Corrida (TBE ou TAE)

TAE 50x

Tris base	2,42 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA 0,5M	100 mL

G. Tampão de amostra 5X

SDS	0,5 g
Glicerol	5,0 mL
Azul de bromofenol	0,5 mL
Tris pH 6,8	0,5 mL
Uréia	3,0 g
H ₂ O bi-destilada	q.s.p 10 mL

Dissolver a uréia em 1,5 mL de H₂O bi-destilada em banho-maria a 56°C, em seguida o SDS. Acrescentar os demais reagentes e por último o glicerol. Homogenizar bem, alíquote em tubos de plástico e armazenar a 4°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Barker, K. Eletroforese In: Na bancada: manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas. Porto Alegre: Artmed, 2002. pp.389-418.

COLORAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA PELA PRATA



- 1)** TCA 10% (1): 30 min. a 4°C (pode deixar incubado de um dia para o outro).
- 2)** 50 g de TCA, 500 mL H₂O bidestilada. Guardar em frasco escuro a 4°C.
- 3)** Solução fixadora (2): lavar 3x por 10 min.
25 mL de etanol, 12,5 mL ácido glacial, H₂O bi-destilada q.s.p. 250 mL.
Guardar em vidro escuro à temperatura ambiente.
- 4)** Solução oxidante (3): 5 min.
0,1 g dicromato de potássio; 0,202 g ácido cítrico; H₂O bi-destilada q.s.p. 100 mL. Guardar em frasco escuro a temperatura ambiente.
- 5)** H₂O: lavar 2x por 5 min.
- 6)** Solução nitrato de prata (4): 20 min. no escuro.
0,051g AgNO₃ em 25 mL H₂O. Preparar na hora do uso.
- 7)** H₂O - 1 minuto.
- 8)** Solução redutora (5): 30 segundos ou até o aparecimento de bandas.
0,741g carbonato de sódio; formaldeído 25 µL (que não tenha precipitado no fundo e de preferência da marca MERCK), 25 µL de H₂O. Adicionar o formaldeído no uso.
- 9)** Solução descolorante.
50 mL Ácido acético glacial, H₂O bi-destilada q.s.p. 1000 mL.
- 10)** Solução para secagem do gel.
100 mL etanol, 10 mL glicerol, H₂O bi-destilada q.s.p. 500 mL.
Utilizar celofane que “enruga” ao molhar, retirar todas as bolhas e deixar secar a temperatura ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Barker, K. Eletroforese In: Na bancada: manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas. Porto Alegre: Artmed, 2002. pp.389-418.

FOTODOCUMENTAÇÃO E REGISTRO DE RESULTADOS DE PCR

FOTODOCUMENTAÇÃO.

- 1) Após visualizar os produtos de amplificação em gel de poliacrilamida ou agarose, fotografar os resultados.
- 2) Ligar a máquina fotográfica NIKON.
- 3) Para fotografar, coloque no **módulo M** e configurar **sem flash**  e **macro**  Para focar a foto, manter pressionado o botão que tira a foto até o quadradinho do centro ficar vermelho e fotografar.
- 4) Verificar se a foto está boa antes de descartar o gel.
- 5) Conectar a máquina fotográfica ao computador com o cabo USB.
- 6) Ligar a máquina.
- 7) Se uma janela do programa NERO aparecer, selecionar o botão “NÃO”.
- 8) Em “**MEU COMPUTADOR**” abrir o disco removível referente à máquina.
- 9) Abrir a pasta “**DCIM**”.
- 10) Abrir a pasta “**100NIKON**”.
- 11) Selecionar as fotos do gel e transferi-las para a pasta no computador.
- 12) Apagar as fotos da máquina fotográfica (pasta **100NIKON**).
- 13) Desligar a máquina e desconectá-la do computador.
- 14) As fotos estarão gravadas com nomes iniciando em **DSCNxxxx.JPG**.
- 15) Renomear o gel com a **data ao contrário**. Exemplo: data 15/06/11, renomear arquivo como 110615.JPG

EDIÇÃO DAS FOTOS

- 1) Com o botão do lado direito do mouse selecionar a opção “**Abrir com**”. Escolher um dos programas: **Nikon editor** ou **Microsoft Office Picture**

manager 

NIKON EDITOR

Esse programa só permite girar a figura 90° ou 180°.

- 1) Ao abrir este programa você verá duas caixas com ferramentas de edição e o seu gel ao fundo.
- 2) Caso as caixas não estejam visíveis, selecionar a opção “**View**”, “**show tool palette 1**” e “**show quick tools**”.
- 3) Modificar a foto com as ferramentas: cortar, girar, colocar em preto e branco (“**general adjustments**”, “**effect**” e “**Black and White**”) e salvar alterações.

MICROSOFT OFFICE PICTURE MANAGER.



Programa mais fácil de ser usado, porém não permite modificar a figura para preto e branco. O que pode ser realizado posteriormente no **Microsoft Word**.

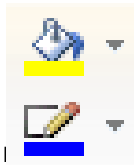
- 1) Selecionar a opção “**Editar imagens**”. Abrir a barra lateral com as ferramentas para a edição da imagem.
- 2) Salvar a nova figura.

INVERTER CORES

- 1) Abrir o programa **PAINT**.
- 2) Abrir o arquivo com a foto em preto e branco.
- 3) Selecionar a opção **IMAGEM** e a opção **INVERTER CORES**.
- 4) Salvar a imagem.

REGISTRO DAS AMOSTRAS

- 1) Abrir o **Microsoft Word** e procurar o formulário de bancada referente ao iniciador utilizado, por exemplo, o do *kDNA*.
- 2) Preencher os dados da amostra e dados da reação de PCR.
- 3) Inserir a figura do gel. “**INSERIR**”, “**IMAGEM**”, procurar pasta e a foto do gel.
- 4) Ao inserir a figura, aparecerá uma nova barra de ferramentas onde você poderá fazer as últimas modificações na figura. Esta reaparecerá sempre que se “clique” duas vezes sobre a figura.
- 5) Para deixar a figura em preto e branco, procurar a ferramenta “**recolorir**” na parte superior a esquerda. Selecionar a opção “**Escala de cinza**”.
- 6) Após editar a imagem, colocar a escala do padrão de peso molecular e o código das amostras no gel. Para tal, selecionar a opção “**INSERIR**”, “**CAIXA DE TEXTO**”, “**DESENHAR CAIXA DE TEXTO**”.
- 7) Desenhar a caixa de texto onde desejar. Utilizar estes dois botões para retirar o contorno e a cor de fundo da caixa de texto.



- 8) Salvar o formulário com o nome da amostra e o código da amostra no mero da pasta de PCR onde ficará o relatório impresso.

APÊNDICE D- Tabelas de contingência 2x2 de cada teste molecular estudado para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar

PCR - *its1*

Teste	Doença		Total	
	Presente	Ausente		
Positivo	80	0	80	VPP = 80 / 80 = 100%
Negativo	60	102	162	VPN = 102 / 162 = 63,0%
Total	140	102	242	LRP = 0,571 / 1 - 1 = ∞
				LRN = 1 - 0,571 / 1 = 0,43
				Ef = (80 + 102) / 242 = 75,2%

PCR - *its1* re-amplificação

Teste	Doença		Total	
	Presente	Ausente		
Positivo	120	0	120	VPP = 120 / 120 = 100%
Negativo	20	102	122	VPN = 102 / 122 = 83,6%
Total	140	102	242	LRP = 0,857 / 1 - 1 = ∞
				LRN = 1 - 0,857 / 1 = 0,14
				Ef = (120 + 102) / 242 = 91,7%

PCR - *hsp70*

Teste	Doença		Total	
	Presente	Ausente		
Positivo	89	0	89	VPP = 89 / 89 = 100%
Negativo	41	102	143	VPN = 102 / 143 = 71,3%
Total	130	102	232	LRP = 0,684 / 1 - 1 = ∞
				LRN = 1 - 0,684 / 1 = 0,32
				Ef = (89 + 102) / 232 = 82,3%

APÊNDICE E- Dados epidemiológicos e resultados de exames clínicos de rotina e moleculares do grupo controle.

ID	Sexo	Idade	UF	Pesquisa Direta	Cultura	IDRM	kDNA	its1	its1 2x	hsp70	Diagnóstico Provável
1	M	79	PR	NR	CONT.	13	P	N	N	P	Mucosa
2	M	32	PA	P	P	N	P	P	P	N	Cutânea
3	M	79	MG	N	NR	15	P	P	P	P	Mucosa
4	M	SR	AC	P	N	N	P	P	P	P	Cutânea
5	M	48	BA	NR	P	N	P	P	P	N	Mucosa
6	M	79	PR	NR	CONT.	13	P	P	P	P	Mucosa
7	F	55	BA	NR	N	20	P	P	P	P	Mucosa
8	F	47	SR	NR	N	N	P	P	P	P	Cutânea
9	F	52	PE	NR	N	10	P	P	P	P	Mucosa
10	F	59	SR	NR	N	N	P	P	P	P	Cutânea
11	M	45	BA	NR	N	15	P	P	P	P	Mucosa
12	M	56	BA	NR	CONT.	23	P	P	P	P	Mucosa
13	F	41	SP	NR	N	NR	P	N	P	P	Cutânea
14	M	90	BA	P	P	8	P	P	P	P	Mucosa
15	M	6	SP	NR	NR	10	P	P	P	P	Cutânea
16	M	66	SP	NR	NR	NR	P	P	P	P	Mucosa
17	M	83	MG	NR	CONT.	22	P	P	P	P	Mucosa
18	M	29	BA	NR	CONT.	NR	P	N	P	P	Cutânea
19	M	69	SP	NR	CONT.	10	P	P	P	P	Mucosa
20	F	75	BA	P	NR	N	P	P	P	P	Cutânea
21	M	59	PR	NR	CONT.	10	P	P	P	P	Mucosa
22	M	43	MA	NR	CONT.	N	P	N	P	N	Cutânea
23	M	17	SP	P	N	10	P	P	P	P	Cutânea
24	M	52	BA	NR	N	6	P	N	P	N	Cutânea
25	F	SR	BA	P	N	20	P	N	P	P	Mucosa
26	M	41	BA	N	CONT.	N	P	N	N	N	Mucosa
27	M	47	SR	NR	CONT.	NR	P	N	N	P	Mucosa
28	F	66	PR	NR	CONT.	N	P	N	P	P	Cutânea
29	M	78	MG	P	P	10	P	P	P	P	Mucosa
30	M	65	BA	NR	N	17	P	N	P	N	Mucosa
31	M	62	SP	NR	P	NR	P	P	P	P	Cutânea
32	M	34	SP	NR	N	NR	P	N	P	P	Cutânea
33	F	78	BA	NR	CONT.	NR	P	N	N	N	Cutânea
34	M	38	SP	N	N	NR	P	P	P	P	Cutânea
35	F	22	CE	P	P	NR	P	P	P	N	Cutânea
36	M	35	SR	P	P	NR	P	P	P	P	Cutânea
37	F	31	BA	P	N	10	P	P	P	P	Cutânea
38	F	43	BA	NR	N	13	P	N	N	N	Mucosa
39	M	82	SP	I	N	5	P	P	P	P	Mucosa
40	M	57	BA	NR	N	NR	P	N	P	N	Mucosa

ID	Sexo	Idade	UF	Pesquisa Direta	Cultura	IDRM	kDNA	its1	its1 2x	hsp70	Diagnóstico Provável
41	M	66	SP	P	CONT.	N	P	P	P	N	Cutânea
42	F	21	BA	P	CONT.	NR	P	P	P	N	Cutânea
43	M	18	BA	P	CONT.	NR	P	P	P	P	Cutânea
44	M	43	SP	P	CONT.	N	P	N	P	P	Cutânea
45	F	14	SP	P	CONT.	N	P	N	N	P	Cutânea
46	M	50	PE	P	N	15	P	N	N	P	Mucosa
47	M	30	Exterior	I	CONT.	N	P	N	N	P	Cutânea
48	M	40	MG	I	N	8	P	N	P	N	Cutânea
49	M	39	RJ	I	P	10	P	N	N	N	Cutânea
50	M	90	SP	NR	CONT.	9	P	P	P	P	Mucosa
51	M	58	PR	NR	CONT.	NR	P	P	P	P	Mucosa
52	M	32	PA	P	P	N	P	N	P	P	Cutânea
53	M	26	BA	NR	CONT.	NR	P	P	P	N	Mucosa
54	M	49	SP	NR	CONT.	12	P	P	P	P	Mucosa
55	M	36	SR	P	P	NR	P	P	P	N	Cutânea
56	F	42	SR	NR	NR	N	P	P	P	P	Cutânea
57	M	30	BA	P	N	6	P	N	P	P	Cutânea
58	M	61	MG	P	P	N	P	P	P	P	Cutânea
59	M	69	BA	NR	P	N	P	N	P	P	Mucosa
60	M	69	MT	P	P	NR	P	P	P	P	Cutânea
61	M	63	MT	P	N	5	P	P	P	P	Cutânea
62	M	74	SP	NR	N	12	P	N	P	N	Mucosa
63	M	58	RN	P	N	NR	P	P	P	P	Cutânea
64	M	83	SP	P	P	N	P	P	P	P	Cutânea
65	M	51	BA	I	CONT.	25	P	N	P	N	Mucosa
66	F	49	SP	NR	N	20	P	N	N	P	Mucosa
67	M	56	MG	NR	N	N	P	N	P	P	Mucosa
68	F	40	BA	P	P	13	P	P	P	N	Cutânea
69	M	35	Exterior	NR	N	NR	P	N	P	P	Cutânea
70	M	76	BA	NR	N	10	P	N	P	P	Mucosa
71	F	49	CE	P	P	9	P	P	P	P	Cutânea
72	M	73	SR	NR	CONT.	15	P	N	P	P	Mucosa
73	M	59	BA	P	CONT.	NR	P	P	P	P	Mucosa
74	M	23	MG	P	NR	22	P	P	P	P	Cutânea
75	M	26	SR	P	NR	N	P	N	P	P	Cutânea
76	M	45	SR	NR	CONT.	15	P	N	P	P	Mucosa
77	M	74	SP	NR	CONT.	10	P	P	P	N	Mucosa
78	M	46	SP	I	N	NR	P	N	P	P	Cutânea
79	M	35	PI	I	N	N	p	N	P	N	Mucosa
80	M	48	BA	P	P	NR	P	P	P	N	Cutânea
81	F	47	SR	NR	CONT.	NR	P	P	P	P	Cutânea
82	F	10	SP	P	NR	NR	P	N	P	N	Cutânea
83	F	32	SP	P	CONT.	NR	P	N	P	P	Cutânea
84	F	23	SP	P	P	N	P	N	N	N	Cutânea

ID	Sexo	Idade	UF	Pesquisa Direta	Cultura	IDRM	kDNA	its1	its1 2x	hsp70	Diagnóstico Provável
85	F	67	SP	P	NR	NR	P	P	P	N	Mucosa
86	F	84	MG	I	CONT.	20	P	N	N	P	Mucosa
87	M	52	MT	NR	N	18	P	P	P	P	Mucosa
88	M	52	MT	NR	P	18	P	P	P	P	Mucosa
89	F	62	SP	I	N	NR	P	P	P	N	Cutânea
90	M	58	PB	NR	P	NR	P	P	P	P	Mucosa
91	M	58	PB	NR	P	NR	P	P	P	N	Mucosa
92	F	9	MA	P	N	N	P	P	P	P	Cutânea
93	M	22	MG	P	N	NR	P	P	P	P	Cutânea
94	M	48	BA	P	P	14	P	P	P	P	Cutânea
95	F	61	MG	NR	CONT.	N	P	P	P	P	Mucosa
96	M	26	Exterior	P	NR	10	P	P	P	N	Cutânea
97	M	24	BA	P	N	10	P	P	P	P	Cutânea
98	F	9	PI	P	N	NR	P	N	N	N	Cutânea
99	M	65	BA	P	P	17	P	N	P	N	Mucosa
100	F	19	MG	I	N	N	P	N	N	N	Cutânea
101	M	29	Exterior	I	N	5	P	N	P	P	Cutânea
102	M	83	SR	NR	CONT.	15	P	N	P	P	Mucosa
103	M	24	PA	NR	P	10	P	N	N	P	Mucosa
104	M	27	SP	P	P	10	P	N	P	N	Cutânea
105	M	59	SP	NR	CONT.	N	P	P	P	N	Mucosa
106	M	60	PE	P	P	N	P	P	P	P	Cutânea
107	F	27	PA	P	P	5	P	P	P	P	Cutânea
108	M	21	SP	P	P	NR	P	P	P	P	Cutânea
109	M	36	BA	P	N	8	P	P	P	P	Cutânea
110	F	65	MT	NR	CONT.	10	P	P	P	P	Mucosa
111	F	56	SP	I	N	NR	P	N	P	N	Cutânea
112	M	80	SP	N	N	5	P	P	P	P	Cutânea
113	F	SR	BA	NR	N	NR	P	N	P	N	Cutânea
114	F	88	SP	I	CONT.	15	P	P	P	P	Mucosa
115	F	44	SP	P	P	9	P	P	P	P	Cutânea
116	M	65	SP	P	P	NR	P	P	P	P	Cutânea
117	M	70	MA	P	CONT.	10	P	P	P	P	Mucosa
118	M	SR	SR	NR	CONT.	NR	P	P	P	P	Mucosa
119	F	24	BA	N	N	5	P	P	P	P	Cutânea
120	F	SR	BA	P	N	NR	P	N	N	N	Cutânea
121	F	37	PA	P	CONT.	N	P	N	P	N	Mucosa
122	F	10	MG	N	P	NR	P	P	P	P	Mucosa
123	F	59	MG	P	P	10	P	P	P	P	Cutânea
124	F	24	BA	I	P	10	P	N	N	N	Cutânea
125	M	61	SR	P	N	10	P	N	P	P	Cutânea
126	F	SR	SR	N	N	NR	P	N	P	P	Cutânea
127	M	36	BA	I	N	8	P	N	P	N	Cutânea
128	M	78	SR	N	N	NR	P	N	P	P	Cutânea

ID	Sexo	Idade	UF	Pesquisa Direta	Cultura	IDRM	kDNA	its1	its1 2X	hsp70	Diagnóstico Provável
129	F	80	BA	NR	N	10	P	P	P	N	Cutânea
130	F	SR	SR	NR	N	NR	P	N	P	N	Mucosa
131	M	SR	SR	NR	N	NR	P	N	N	NR	Mucosa
132	F	SR	SR	NR	CONT.	NR	P	N	P	NR	Mucosa
133	F	SR	SR	I	NR	NR	P	N	N	NR	Mucosa
134	F	SR	MG	P	NR	14	P	N	P	NR	Cutânea
135	F	SR	SR	I	NR	NR	P	p	p	NR	Cutânea
136	F	SR	MT	I	CONT.	NR	P	p	p	NR	Cutânea
137	M	SR	BA	NR	CONT.	10	P	P	P	NR	Mucosa
138	F	18	BA	P	N	10	P	N	N	NR	Cutânea
139	F	SR	SR	P	P	NR	P	P	P	NR	Cutânea
140	M	29	SR	P	P	NR	P	P	P	NR	Cutânea

IDRM= Intradermoreação de Montenegro; *its1* 2x = Reamplificação com iniciador *its1* SR = sem registro; P = positivo; N = negativo; I = inconclusivo; NR = não realizado; CONT. = contaminação.

APÊNDICE F- Artigo publicado sobre a aplicação da técnica de *kDNA*-PCR em DNA proveniente de biópsias de pacientes atendidos no Instituto Emílio Ribas.

Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo
55(6):393-399, November-December, 2013
doi: 10.1590/S0036-46652013000600004

APPLICABILITY OF *kDNA*-PCR FOR ROUTINE DIAGNOSIS OF AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS IN A TERTIARY REFERENCE HOSPITAL

Marcela M. SATOW(1), Ediz H. YAMASHIRO-KANASHIRO(1), Maysa C. ROCHA(L2), Laina K. OYAFUSO(4), Rita C. SOLER(4), Paulo C. COTRIM(1,2,3) & José Angelo L. LINDOSO(1,2,4)

SUMMARY

This study evaluated the applicability of *kDNA*-PCR as a prospective routine diagnosis method for American tegumentary leishmaniasis (ATL) in patients from the Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER), a reference center for infectious diseases in São Paulo - SP, Brazil. The *kDNA*-PCR method detected *Leishmania* DNA in 87.5% (112/128) of the clinically suspected ATL patients, while the traditional methods demonstrated the following percentages of positivity: 62.8% (49/78) for the Montenegro skin test, 61.8% (47/76) for direct investigation, and 19.3% (22/114) for *in vitro* culture. The molecular method was able to confirm the disease in samples considered negative or inconclusive by traditional laboratory methods, contributing to the final clinical diagnosis and therapy of ATL in this hospital. Thus, we strongly recommend the inclusion of *kDNA*-PCR amplification as an alternative diagnostic method for ATL, suggesting a new algorithm routine to be followed to help the diagnosis and treatment of ATL in IIER.

KEYWORDS: American tegumentary leishmaniasis; Diagnostic; *kDNA*-PCR; *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

INTRODUCTION

American tegumentary leishmaniasis (ATL) presents different clinical manifestations in Latin America, including mucosal leishmaniasis (ML), cutaneous localized leishmaniasis (CL), disseminated leishmaniasis (LCD), and diffuse leishmaniasis (DCL). These manifestations are caused by seven different species of *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergi*, and *L. (V.) shawi*^{1,2}. Currently, the diagnosis of ATL is based mainly on a clinical examination, epidemiological data, and complementary laboratory methods, including direct investigation (DI), Montenegro skin test (MST), and *in vitro* culture³. Nevertheless, these classical diagnostic methods are often time consuming; require an expert in microscopy; have low sensitivity and/or specificity and can be influenced by the age of infection and quality of sampling⁴. Furthermore, these methods are unable to differentiate between the seven species of parasite involved, which can be considered an important failure for the disease prognosis and choice of an appropriate treatment^{5,6}. VOLPINI *et al.*, 2004⁶ described the potential of a PCR-RFLP method performed with primers specific for kinetoplast DNA (*kDNA*) of *Leishmania* genus, followed by *HaeIII* restriction enzyme digestion, for detection of *L. (V.) braziliensis* in infected DNA samples. This species is reported to be the major causative agent of ML in Latin America; and it is estimated that 3-5% of CL patients progress to ML form when infected with this species⁷. The specificity of these specific primers

for the *Leishmania* genus has been reported in previous studies and no cross-reaction was observed for paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, cutaneous tuberculosis, and candidiasis⁸, squamous cell carcinoma, sporotrichosis, leprosy, lentigo, pyodermitis and vascular ulcer⁹.

The identification of *L. (V.) braziliensis* in ATL suspected patients is important for elaboration of accurate prognoses and adequate therapy to prevent the resurgence of lesions, and the progression of the disease¹⁰. Thus, the aim of this study was to evaluate the applicability of the *kDNA*-PCR followed by restriction enzyme analyze method for routine diagnosis of ATL at the IIER.

MATERIAL AND METHODS

Patients. The study was conducted on a convenience sample of 128 patients who attended the Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER), São Paulo, Brazil from March 2007 to January 2012, with clinical signs and symptoms compatible with CL or ML. Cutaneous leishmaniasis was clinically suspected by the presence of ulcer, while mucosal leishmaniasis by the presence of nasal bleeding, drilling nasal septum or infiltrate in mucosal^{11,12}. The results of the clinical examinations, Montenegro skin test, epidemiologic data, and administered drugs were obtained by reviewing the medical records. Collected samples from 128 lesions were transferred for our lab to be analyzed by Direct Investigation, *in vitro* culture and *kDNA* PCR.

(1) Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: mmusatow@usp.br, kanash@usp.br, mayyrocha@yahoo.com.br, pccotrim@usp.br, jlindoso@usp.br
(2) Laboratório de Investigação Médica HC-FMUSP, São Paulo, SP, Brazil.

(3) Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

(4) Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: laizakeiko@uel.com.br; rita@labirmita.com.br

Correspondence to: Marcela M. Satow, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 500, 05403-000 São Paulo, SP, Brazil. E-mail: mmusatow@usp.br

Satow MM, Yamashiro-Kanashiro EH, Rocha MC, Oyafuso LK, Soler RC, Cotrim PC, et al. Applicability of *kDNA*-PCR for routine diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a tertiary reference hospital. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2013 Nov-Dec;55(6):393-9.

ANEXO A- Carta com o parecer do comitê de ética em pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

COORDENADORIA DOS SERVIÇOS DE SAÚDE

INSTITUTO DE INFECTOLOGIA "EMILIO RIBAS"

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Av. Dr. Arnaldo, 165 - Cerqueira César - São Paulo - SP

CEP: 01246-900 – TEL: 3896-1406

E-mail: comitedeetica-ier@ig.com.br

PARECER

PROCOLO DE PESQUISA N.º 32/09

PARECER N.º 326/2009

Data: 16/9/2009

Título da Pesquisa: "Aplicação da reação em cadeia de polimerase no diagnóstico espécie-específico da leishmaniose tegumentar americana na prática clínica"

Pesquisador Responsável: Dr. José Ângelo Lauletta Lindoso

CONSIDERAÇÕES: O Comitê de Ética em Pesquisa considera respondida as pendências do parecer anterior e Aprova o estudo e seu TCLE.

(X) APROVADO

() APROVADO COM RECOMENDAÇÕES

() REPROVADO

() COM PENDÊNCIAS- OBS.: a ausência de resposta em 60 dias, acarretará em arquivamento do processo por falta de interesse do pesquisador.

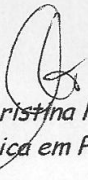
TEMÁTICA ESPECIAL

SIM NÃO

CONEP

SIM NÃO

SVS (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA) SIM NÃO


Dra. Anna Christina Nunes D'Ambrosio
Comitê de Ética em Pesquisas - I.I.E.R.

ANEXO B- Carta do parecer do comitê de ética em pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone:(55-11)3061-7066/8650 e 3064-5132 FAX: (55-11)
3064-5132 e 3062-2174

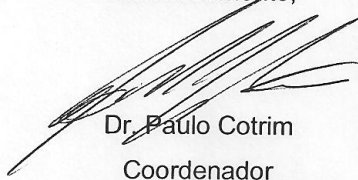


São Paulo, 1º de julho de 2009.

Ilmo. Sr.
Paulo Cotrim

A Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em reunião efetuada na presente data, analisou e **aprova** o projeto de pesquisa CEP-IMT 046/2009 "Aplicação da reação em cadeia da polimerase no diagnóstico espécie-específico da leishmaniose tegumentar americana na prática clínica", sob a sua responsabilidade e orientação. O presente projeto utiliza material humano (soro) e deverá ser encaminhado para a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Atenciosamente,



Dr. Paulo Cotrim
Coordenador

Comissão de Ética
Instituto de Medicina Tropical
de São Paulo

ANEXO C- Carta de ciência do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da USP.



CIÊNCIA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **11.04.12** tomou ciência do Projeto nº **106/12** intitulado **“Avaliação de um marcador molecular para identificação interespecífica de Leishmania spp, baseado no gene do transportador ABC-PRP1.”**, vinculado à pós-graduação do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo que não envolverá atividade prática e/ou experimental no âmbito da Faculdade de Medicina ou Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e que conta com prévia aprovação da Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

Pesquisador(a) Responsável: Dr. Paulo Cotrim

Pesquisador(a) Executante : Marcela Miura Satow

CEP-FMUSP, 11 de abril de 2012.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa