Universidade de São Paulo

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Natalia Souza de Godoy

Algoritmo para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral

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

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

**Orientadora: Dra. Lúcia Maria Almeida
Braz**

São Paulo

2016

NATALIA SOUZA DE GODOY

Algoritmo para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral

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

Área de Concentração: Doenças Tropicais e
Saúde Internacional.

Orientadora: Dra. Lúcia Maria Almeida Braz

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

Godoy, Natalia Souza de

Algoritmo para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral / Natalia Souza de Godoy. – São Paulo, 2016.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Lúcia Maria Almeida Braz

Descritores: 1. LEISHMANIA INFANTUM. 2. LEISHMANIOSE VISCERAL. 3. ENZIMAS DE RESTRIÇÃO. 4. REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE

USP/IMTSP/BIB-10/2016.

Dedico este trabalho aos meus queridos e amados pais, Cássia e Manoel, ao meu amado esposo Marcelo, à minha irmã Ramona e sobrinhos. E aos meus avós (*in memoriam*) Marli, Edith e Nino . E à família, razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Lúcia Maria Almeida Braz por acreditar no meu potencial, pela intensa dedicação, valiosos ensinamentos, pela amizade e carinho.

À Profa. Dra. Thelma Suely Okay pelo apoio desde o começo do projeto, pela participação em todos os aspectos do trabalho e por me acolher em seu laboratório para a realização dos testes moleculares, bem como pela utilização de seus aparelhos, como o Gelbot.

Ao querido mestre Prof. Dr. Vicente Amato Neto, pelo constante incentivo e amizade ao longo dos anos.

À Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino pelas sugestões e por ter apoiado o desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Júnior pela colaboração e pelo fornecimento das amostras de pacientes com leishmaniose visceral confirmada procedentes do Mato Grosso do Sul.

A FAPESP por financiar projeto (Processo nº 2010/50304-8) que deu origem a este trabalho.

À Dra Gilda Del Negro – do Laboratório de Micologia Médica – por me acolher em seu laboratório para a realização de alguns testes moleculares.

Ao Dr. Carlos Henrique Valente Moreira - do Instituto Adolfo Lutz - pela realização dos testes estatísticos.

À Dra Vera Lucia P. Chioccola – do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz - por ceder os oligonucleotídeos iniciadores RV1 e RV2.

Ao Dr. José Angelo Lauletta Lindoso e à funcionária Elizabeth, pelo fornecimento de algumas das amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar.

Aos médicos infectologistas: Prof. Dr Valdir Sabbaga Amato e seus residentes do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, ao Dr. Jose Ângelo Lauletta Lindoso e Dr. Carlos Henrique Valente Moreira do Instituto Adolfo Lutz e à Profª Dra Heloisa Helena Marques do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo envio das amostras do projeto FAPESP (2010/50304-8)

À funcionária Elisângela Quedas e ao aluno Lucas Santana pelo sequenciamento e análise das amostras sequenciadas.

Aos alunos e amigos Marcos Andrino e Pamela Bianchini pelo auxílio na realização de testes laboratoriais do presente trabalho.

Ao doutorando Antônio Charlys Costa, pelos valiosos conselhos no que diz respeito ao diagnóstico molecular.

À doutoranda e colega de trabalho Regina Maia de Souza, pelos valiosos ensinamentos em diagnóstico das leishmanioses.

À Dra. Carolina Stocco Lima - do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM 50) - por ceder cepas de *Leishmania* para a realização de testes de especificidade deste estudo.

À Edite H. Y. Kanashiro, MsC - do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunologia do Instituto de Medicina Tropical - pelo fornecimento de cepa de *L. major*.

À Dra. Eunice Gallatti da Faculdade de Saúde Pública – por ceder “pool” de amostras de flebotomíneos infectados com *Leishmania*.

À Dra. Flaviane Alves de Pinho – Laboratório de Soroepidemiologia e Imunologia do Instituto de Medicina Tropical – por ceder as amostras de cães.

Ao Prof. Dr. Hélio Bacha pelo fornecimento de DNA de *Mycobacterium tuberculosis*.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Levi pelo fornecimento de amostras de doadores de sangue, utilizadas como controles negativos do presente projeto.

À Dra. Lícia Natal - do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical- pelo fornecimento de amostra de paciente com malária por *Plasmodium falciparum*.

À doutoranda Lidia Yamamoto - do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunologia do Instituto de Medicina Tropical - pelo fornecimento de DNA de cepas de *Toxoplasma gondii*.

À Mônica Scarpelli Martinelli Vidal, MsC – Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo por ceder DNA de *Histoplasma capsulatum* para a realização de testes de especificidade deste estudo.

À minha irmã Ramona Souza de Santana e familiares, pela coleta e disponibilidade, respectivamente, de amostras iniciais utilizadas como controles negativos do presente projeto.

Ao Dr. Ricardo Zampieri - do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - por ceder cepas de *Leishmania* para a realização de testes de especificidade deste estudo.

À querida secretária da seção de pós-graduação, Eliane Araújo, pelo carinho, pela competência e pela disposição em ajudar.

Aos colegas e amigos de trabalho que fiz ao longo desses 6 anos no Laboratório de Parasitologia – LIM 46 pelos momentos de descontração e pelos ensinamentos.

Aos amigos do IMT pela motivação, troca de experiências e principalmente amizade: Mara, Carolina, Mariana, Thamiris Prata, Pâmela Bianchini, Lucas, Nelson, Roberto, Charlys, Adenilson, Thiago, Raquel, Fátima, Cleide, Marcos, Thaynan, Júlio, Jhonatas, Flaviane, Benícia, Sueli, Ana Paula, Andreia Alcaia, Roberta, Bete, Daiane, Renata, Sandra, Sr José, D. Joana, Ester Aquino, Paulo, Marcia, Érika Gakiya, Cleide Conceição.

À minha família, essencial em minha vida.

Aos meus tios Ana Cristina, Carolina e Alex e aos primos Rodrigo e Rebeca por todo o incentivo.

Aos meus pais Cássia e Manoel, por tudo.

À minha irmã e grande amiga Ramona, por ser exemplo a ser seguido.

Às minhas cunhadas Andreia e Adriana, ao meu cunhado Valdomiro e aos meus sobrinhos Davi, Júlia, Enzo, Rafaella, Brenda, Pedro, Emily S, Emily G, Jenniffer, Sabrina, Larissa e Jefferson, todos muito queridos, agradeço pelos momentos de felicidade.

À minha querida sogra Lurdinha.

Ao meu maravilhoso e compreensivo esposo e melhor amigo Marcelo Vieira de Godoy.

RESUMO

de Godoy NS. Algoritmo para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

A definição de caso confirmado de leishmaniose visceral é baseada em aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. As técnicas padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral são as parasitológicas esfregaço e cultura de aspirado de medula óssea, que permitem a identificação do gênero *Leishmania* por visualização microscópica do parasito em lâmina, e os testes sorológicos, como o imunocromatográfico, que apresenta baixa sensibilidade em indivíduos imunodeprimidos. Em determinadas situações, como na coinfeção *Leishmania*/HIV, para o tratamento específico ou nos inquéritos epidemiológicos, faz-se necessária a identificação do agente etiológico da leishmaniose visceral, que comumente é a *L. (L.) infantum*. Desse modo, propusemos um algoritmo para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral, com o emprego da kDNA PCR (K20-K22 E RV1-RV2) do ITS1 PCR (LITSR e L5. 8S), tendo como referência os resultados obtidos nos exames parasitológicos e sorológicos, além de dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes. Complementando nossa proposta, a realização da técnica de análise dos polimorfismos dos fragmentos da ITS1 PCR por RFLP, para identificação do agente etiológico, foi avaliada como alternativa à laboriosa técnica de eletroforese de isoenzimas, padrão-ouro para definição de espécies no diagnóstico das leishmanioses. As técnicas moleculares empregadas foram validadas em 82 amostras (ITS 1 PCR e kDNA PCR RV1-RV2) e 48 amostras (kDNA PCR K20-K22) de pacientes com leishmaniose visceral confirmada e em 30 amostras de pacientes saudáveis. Os ensaios obtiveram as seguintes sensibilidades: 97,5% (80/82) na ITS1 PCR, 98% (47/48) na kDNA PCR K20-K22, e 92,7% (76/82) na kDNA PCR RV1-RV2, e 100% de especificidade em todos os testes. Quando comparados os resultados obtidos nos testes moleculares ITS1 PCR, kDNA PCR K20-K22 e kDNA PCR RV1-RV2 ao padrão ouro observou-se uma concordância quase perfeita, com um índice kappa maior que 0,80, e um valor de $p < 0,001$. No que concerne à

realização da ITS1 PCR RFLP nas 80 amostras positivas, 52,5% (42/80) demonstraram perfil semelhante ao de *L. (L.) infantum*. Três das amostras que não demonstraram perfil na RFLP da ITS1 PCR e na kDNA PCR K20-K22 obtiveram mais de 90% de identidade com a cepa de *L. (L.) chagasi*, mediante análise das amostras na técnica do sequenciamento.

Concluimos o presente estudo com a proposta de um algoritmo de diagnóstico molecular da leishmaniose visceral, que deverá considerar a realização prévia do diagnóstico parasitológico e imunocromatográfico. E sugerimos, quando necessário, a realização da kDNA PCR K20-K22 e a kDNA PCR RV1-RV2 para a determinação do gênero e de subgênero da *Leishmania*, respectivamente. Por fim, que se complemente com a ITS1 PCR, seguida da ITS1 RFLP para a definição do agente etiológico da leishmaniose visceral.

Descritores: *Leishmania infantum*; leishmaniose visceral; enzimas de restrição; reação em cadeia por polimerase.

ABSTRACT

de Godoy, NS. Algorithm for molecular diagnosis of visceral leishmaniasis. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

The definition of visceral leishmaniasis case is based on clinical, epidemiological and laboratory aspects. The gold standard techniques for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis are parasitological, smear and culture of bone marrow aspirate, which allow the identification of *Leishmania* in microscopic visualization, and the serological tests, like the immunochromatographic, which presents low sensitivity in immunodepressed individuals. In certain situations, such as *Leishmania*/HIV co-infection, for specific treatment or in epidemiological surveys, it is necessary to identify the etiological agent of visceral leishmaniasis, commonly caused by *L. (L.) infantum*. In this way, an algorithm for the molecular diagnosis of visceral leishmaniasis by kDNA PCR (K20/K22 and RV1/RV2) and ITS1 PCR (LITSR e L5.8S) was proposed, using as the gold standard, the parasitological and serological results, as well as clinical and epidemiological data of patients. Complementing our proposal, the performance of the Restriction Fragment Length Polymorphism of the ITS1 (ITS1 PCR RFLP) to identify the etiological agent, was evaluated as an alternative to technical laboriously isoenzyme electrophoresis, the gold standard for defining species in the diagnosis of leishmaniasis. The molecular techniques were validated on 82 samples (ITS 1 kDNA PCR and PCR-RV1 RV2) and 48 samples (K20-K22 kDNA PCR) from patients with confirmed visceral leishmaniasis and 30 samples from healthy patients. The following sensitivities were presented by the molecular tests: 97.5% (80/82) for the ITS1 PCR, 98% (47/48) for kDNA PCR K20-K22 and 92.7% (76/82) for kDNA PCR-RV2 RV1, and 100% specificity for all tests. When comparing the results from molecular tests ITS1 PCR, kDNA PCR K20-K22 and kDNA PCR RV1-RV2 with the established gold standard, we see an almost perfect agreement with kappa index higher than 0.80, and p value <0.001 were obtained. As regard to ITS1 PCR RFLP, from 80 positive samples, 52.5% (42/80) showed a similar profile to that of *L. (L.) infantum*. Three of the samples that did not demonstrate RFLP profile in the ITS1

PCR and PCR kDNA K20-K22 obtained more than 90% of identity with strain *L. (L.) chagasi*, by analyzing the samples in sequencing. As our conclusion, an algorithm for the molecular diagnosis of visceral leishmaniasis must consider a previous performance of the parasitological and immunochromatographic diagnosis. When necessary kDNA PCR K20-K22 and kDNA RV1-RV2 PCR are suggested to determine the genus and the subgenus *Leishmania*, respectively. In addition, this molecular diagnosis can be complemented, with the ITS1 PCR, followed by RFLP ITS1, which can define the etiological agent of visceral leishmaniasis.

Descriptors: *Leishmania infantum*; visceral leishmaniasis; restriction enzyme; polymerase chain reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo da leishmaniose visceral.	39
Figura 2 - Região ITS1 e IT2 de <i>Leishmania</i> spp.	49
Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose a 2% das amostras submetidas à PCR para o gene da beta-actina, cujo amplificado é de 520 pares de base (pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb. (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (Colunas de 1 a 13) Amostras de pacientes. (CP) Controle positivo da reação da beta-actina.	75
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose a 2% para avaliação do limiar de sensibilidade do iniciador ITS1, representado pelo fragmento de 320 pares de base (pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb. (1 a 10 ⁻²) Nas colunas, em triplicata, de 1 a 10 ⁻² estão representadas as diluições, por mL, das amostras de sangue “batizadas” com promastigotas de cepa <i>L. (L.) chagasi</i> (MHOM/BR/72/strain46.) (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (CP) Controle positivo.....	76
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose a 2% para avaliação do limiar de sensibilidade do iniciador kDNA (K20 e K22), representado pelo fragmento de 120 pares de base (pb). (LD). (100) Padrão de peso molecular de 50 pb. (10 ² a 1) Nas colunas de 10 ² a 1 estão representadas as diluições, por mL, das amostras de sangue “batizadas” com promastigotas de cepa <i>L. (L.) chagasi</i> . (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (CP) Controle positivo de <i>L. (L.) chagasi</i> (MHOM/BR/72/strain46).	77
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose Padrão a 2% para avaliação da especificidade do iniciador kDNA com os oligonucleotídeos K20 e K22 em amostras	

de diferentes patógenos. (50) Padrão de peso molecular de 50 pares de base. (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (Colunas de 4-21) Amostras de diferentes patógenos. (MT) *M. tuberculosis*, (PF) *P. falciparum*, (HC) *H. capsulatum*, (SM) *S. mansoni*, (TG1) *T. gondii* cepa ME49, (TG2) *T. gondii* cepa RH, (TG3) *T. gondii* cepa VEG, (TC) *T. cruzi*, (TB) *T. brucei*, (C+) Controle positivo *L.(L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445). (LB) *L.(V.) braziliensis*. (C+) Controle positivo..... 78

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose a 2% para avaliação da especificidade anal da kDNA PCR RV1-RV2 em amostras de diferentes patógenos. (50) Padrão de peso molecular de 50 pares de base. (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (Colunas de 4-9) Amostras de diferentes patógenos, onde: (MT) *M. tuberculosis*, (PF) *P. falciparum*, (TCZ) *T. cruzi*, (TB) *T. brucei*, (SM) *S. mansoni*, (TG1) *T. gondii* cepa ME49, (TG2) *T. gondii* cepa RH, (TG3) *T. gondii* cepa VEG, (HC) *H. capsulatum*. (C+) Controle positivo *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445)..... 79

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose Metaphor a 4% utilizando cepas referência de *Leishmania* para avaliação da ITS1 PCR RFLP. (50) Padrão de peso molecular de 50 pares de base (pb). (LL) *L. (V.) lainsoni* (160 e 150 pb), (LN) *L. (V.) naiffi* (155pb), (LS), *L.(V.) shawi* (160 e 150 pb), (LB) *L.(V.) braziliensis* (160 e 150 pb), (LG) *L.(V.) guyanensis* (160 e 150 pb), (LA) *L.(L.) amazonensis* (190 e 140 pb), (LC1) *L.(L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445) (180, 70 e 50 pb), (LC2) *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/72/strain46)(180, 70 e 50 pb), (LM) *L.(L.) major* (200 e 140 pb) e (LD) *L.(L.) donovani* (180, 70 e 50 pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb..... 80

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose Metaphor a 4% utilizando cepas referência de *Leishmania* para avaliação da kDNA PCR RFLP. (50) Padrão de peso molecular de 50 pares de base (pb). (LL) *L. (V.) lainsoni* (120pb), (LN) *L. (V.) naiffi* (120, 80,40 pb), (LS) *L. (V.) shawi* (120,80,40 pb), (LB) *L. (V.) braziliensis* (120,80,40 pb), (LG) *L. (V.) guyanensis* (120,80,40 pb), (LA) *L. (L.) amazonensis* (120 pb), (LC1) *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445) (120,80,60 pb), (LC2) *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/72/strain46) (120,80,60 pb), (LM) *L. (L.) major* (120 pb) e (LD) *L. (L.) donovani* (120,80,60 pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb...82

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose a 2% da kDNA PCR RV1-RV2 utilizando cepas referência de *Leishmania*, avaliadas por meio do amplificado de 145 pares de base (pb). (50) Padrão de peso molecular de 50 pb. (LC) *L.(L.) chagasi*, (LB) *L.(V.) braziliensis*, (LG) *L.(V.) guyanensis*, (LN) *L. (V.) naiffi*, (LS), *L.(V.) shawi*, (LA) *L.(L.) amazonensis*..... 83

Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose a 2% da ITS1 PCR em amostras de pacientes com LV confirmada, por meio do amplificado de 320 pares de base (pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb. (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (1, 2 e 3). Amostras de pacientes com LV confirmada. (LC) Controle positivo de *L. (L.) chagasi*..... 84

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose Metaphor a 4% da ITS1 PCR RFLP, para avaliação de perfis obtidos com as amostras dos pacientes com LV confirmada. (50) Padrão de peso molecular de 50 pares de base (pb). (LA) *L. (L.) amazonensis* (190 e 140 pb), (LC) *L. (L.) chagasi* (180,70,50 pb). (1 e 2). Amostras de pacientes com LV confirmada. (LM) *L. (L.) major* (200,140 pb). (LB) *L. (V.) braziliensis* (160,150 pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb. 85

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose a 2% da kDNA PCR K20-K22, de amostras de pacientes com LV confirmada, por meio do amplificado de 120 pares de base (pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb. (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (1 e 2) Amostras de pacientes com LV confirmada. (LC) Controle positivo de *L. (L.) chagasi*. 85

Figura 14– Eletroforese em gel de agarose Metaphor a 4% da kDNA PCR RFLP, para avaliação de perfis obtidos com as amostras dos pacientes com LV confirmada. (50) Padrão de peso molecular de 50 pares de base (pb). (Colunas de 1 a 4) Amostras de pacientes com LV confirmada. (LC) Controle positivo de *L. (L.) chagasi*. (100) Padrão de peso molecular de 100 pb..... 86

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose a 2% para avaliação da sensibilidade da kDNA PCR RV1-RV2 em amostras de indivíduos com LV confirmada, por meio do amplificado de 145 pares de base (pb). (50) Padrão de peso molecular de 50 pb. (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (Colunas de 4 a 10) Amostras de pacientes. (LC) Controle positivo de *L. (L.) chagasi*..... 87

Figura 16- Eletroforese em gel de agarose Metaphor a 4% para avaliação da ITS1 PCR RFLP em amostras de cães com LV confirmada. (50) Padrão de peso molecular de 50 pares de base (pb). (Colunas de 1 a 4) Amostras de cães com LV confirmada. (LC) Controle positivo de *L. (L.) chagasi* (180,70,50 pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb. 105

Figura 17- Eletroforese em gel de agarose a 2% para avaliação da positividade da kDNA PCR RV1-RV2, em amostras de cães com LVC confirmada, por meio do amplificado de 145 pares de base (pb). (50) Padrão de peso molecular de 50 pb. (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (Colunas de 1 a 6)

Amostras de cães com LVC confirmada. (LC) Controle positivo de *L. (L.) chagasi*.
 105

Figura 18- Eletroforese em gel de agarose Methaphor a 4% para avaliação da ITS1 PCR RFLP, em amostra de “pool” de flebotomíneos infectados com sangue de cão com LVC. (100) Padrão de peso molecular de 100 pares de base (pb). (Colunas de 1 a 2) Amostra de “pool” de flebotomíneo. (LC) Controle positivo de *L. (L.) chagasi*.
 107

Figura 19- Eletroforese em gel de agarose Methaphor a 4% para avaliação da kDNA PCR RFLP em amostra de “pool” de flebotomíneos infectados com sangue de cão com LVC. (100) Padrão de peso molecular de 100 pares de base (pb). (Colunas de 1 a 4) Amostra de flebotomíneo. (CP) Controle positivo de *L. (L.) chagasi*. 108

Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose a 2% para avaliação da kDNA PCR RV1-RV2 em amostra de “pool” de flebotomíneos infectados com sangue de cão com LVC, por meio da amplificação de fragmento de 145 pares de base (pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb. (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (1) Amostra de flebotomíneo. (CP) Controle positivo de *L. (L.) chagasi*. 108

Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose Metaphor 4% da ITS1 PCR RFLP, de amostras sanguíneas dos pacientes com LT confirmada. (50) Padrão de peso molecular de 50 pares de base (pb). (LC1) *L. (L.) chagasi* (180, 70 e 50 pb). (LA) *L. (L.) amazonensis* (190 e 140 pb). (LT1, LT2 e LT3). Amostras de pacientes com LT confirmada. (LB) *L. (V.) braziliensis* (160 e 150 pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb. 109

Figura 22- Eletroforese em gel de agarose a 2% para avaliação da kDNA PCR RV1-RV2 em amostras de pacientes com LT. (100) Padrão de peso molecular de 100 pares de base (pb). (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (1 e 2) Amostras de pacientes com LT. (CP) Controle positivo de <i>L. (L.) chagasi</i>	110
Figura 23- Alinhamento das sequências de <i>L. (L.) chagasi</i> (MHOM/BR/81/M6445) e da sequência referência KF985171.1 de <i>Leishmania</i>	112
Figura 24- Figura do alinhamento das amostras com destaque mediante utilização de seta e coloração marrom para os dois sítios de restrição encontrados na amostra, que, por conseguinte geram os 3 fragmentos nas amostras de pacientes com LV (Grupo I) e de cães com LV (Grupo V).	113
Figura 25 - Algoritmo de processamento de amostras de pacientes com suspeita de LV proposto para o diagnóstico molecular da LV ao nível de espécie.	134

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Gráfico gerado pelo aparelho GelBot (Loccus Biotecnologia/Brasil) após análise das amostras submetidas à ITS1 PCR e ITS1 PCR RFLP. Em vermelho encontra-se o padrão molecular utilizado pelo aparelho, contendo indicação dos 20 pb e 1000 pb indicados por setas, com suas respectivas bandas presentes em cada amostra. Em azul há demonstração do pico de 318 pares de base correspondente à *L. (L.) amazonensis*; em verde 326 pares de base correspondente à *L. (L.) chagasi*; em preto picos que representam os padrões de 182,73 e 53 pares de base obtidos na ITS1PCR RFLP para *L. (L.) chagasi*, e em roxo picos que representam os padrões de 186 e 40 pares de base obtidos na ITS1 PCR RFLP para *L. (L.) amazonensis*..... 111

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Principais espécies causadoras de leishmanioses no mundo, etiologia, procedência e clínica, classificadas de acordo com subgênero..... 32
- Quadro 2** - Medicamentos utilizados para o tratamento da LV nas Américas, dose recomendada e duração do tratamento em pacientes imunocompetentes, em coinfectados com *Leishmania*/HIV e pacientes com lesão dérmica pós kalazar*..... 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Leishmania</i> e número do código internacional das cepas empregadas.....	55
Tabela 2 - Descrição dos grupos com menção ao número de amostras, de pacientes, de animais e de patógenos analisados nos testes moleculares empregados.	59
Tabela 3 - Descrição dos iniciadores da beta-actina, peso molecular do fragmento amplificado, artigo referência e condições da PCR para a beta-actina.	63
Tabela 4 - Descrição dos iniciadores ITS1 PCR, peso molecular do fragmento amplificado, artigo referência e condições da ITS1 PCR padronizada.....	65
Tabela 5 - Descrição dos iniciadores da kDNA PCR, peso molecular do fragmento amplificado, artigo referência e condições da kDNA PCR K20-K22.	67
Tabela 6 - Condições da kDNA PCR RV1-RV2, em amostras de pacientes do complexo HCFMUSP.	69
Tabela 7 - Amostras analisadas no sistema de eletroforese capilar Gelbot.	72
Tabela 8 - Polimorfismo dos fragmentos de restrição gerados nas amostras de cepas referências de <i>Leishmania</i> sp, após técnica de análise do polimorfismo por RFLP com <i>Hae</i> III, em produtos da ITS1 PCR com os oligonucleotídeos LITSR e L5.8S, de acordo com a literatura consultada.....	79
Tabela 9 - Polimorfismo dos fragmentos de restrição gerado nas amostras de cepas referências de <i>Leishmania</i> sp, após técnica do polimorfismo por RFLP mediante a utilização da enzima <i>Hae</i> III em produtos da kDNA PCR K20-K22(kDNA PCR RFLP).....	81
Tabela 10 - Resultados obtidos nas técnicas padrão-ouro para o diagnóstico da leishmaniose visceral e nos testes moleculares ITS1 PCR, kDNA PCR K20-K22 e	

kDNA PCR RV1-RV2 empregados nas amostras de pacientes com leishmaniose visceral, seguidos da definição do agente etiológico após a realização do RFLP. 88

Tabela 11 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, probabilidade de resultado falso positivo, probabilidade de resultado falso negativo e eficiência da ITS1 PCR (LITSR e L5. 8S) e da kDNA PCR K20-K22, e kDNA PCR RV1-RV2, nas amostras com positividade confirmada para LV (Grupo I) e amostras de indivíduos saudáveis (Grupo II), tendo como referência a positividade da clínica, da epidemiologia, dos testes parasitológicos e/ou teste imunocromatográfico. 99

Tabela 12 - Análise comparativa dos resultados da ITS1 PCR (LITSR e L5. 8S), da kDNA PCR K20-K22 e da kDNA PCR RV1-RV2 nas amostras com positividade confirmada para leishmaniose visceral (Grupo I) e amostras de indivíduos saudáveis (Grupo II), tendo como referência a positividade da clínica, da epidemiologia, dos testes parasitológicos e/ou teste imunocromatográfico (padrão-ouro)..... 100

Tabela 13 - Tabela comparativa dos resultados obtidos na ITS1 PCR e kDNA PCR K20-K22 utilizando amostras de pacientes com leishmaniose visceral confirmada (Grupo I)..... 101

Tabela 14 - Tabela comparativa dos resultados obtidos na ITS1 PCR e kDNA PCR RV1-RV2 nas amostras de pacientes com leishmaniose visceral confirmada (Grupo I)..... 102

Tabela 15 - Tabela comparativa dos resultados obtidos na kDNA PCR RV1-RV2 e na kDNA PCR K20-K22..... 102

Tabela 16 - Resultados obtidos em técnica padrão-ouro para o diagnóstico da leishmaniose visceral e nos testes moleculares (ITS1 PCR, kDNA PCR K20-K22 e

kDNA PCR RV1-RV2,) com as amostras de cães com leishmaniose visceral (Grupo V), seguidos da definição do agente etiológico por RFLP.....	106
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>BHI</i> (sigla em inglês de <i>Brain Heart Infusion</i>)	Infusão de cérebro e coração de carneiro
<i>BOD</i> (sigla em inglês de <i>Biochemical oxygen demand</i>)	Demanda bioquímica de oxigênio
<i>DNA</i> (sigla em inglês de <i>deoxyribonucleic acid</i>)	Ácido desoxirribonucleico
<i>EDTA</i> (sigla em inglês de <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)	Ácido etileno diamino tetracético
<i>ELISA</i> (sigla em inglês de <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EUA HCFMUSP Medicina da Universidade de São Paulo	Estados Unidos da América Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<i>HIV</i> (sigla em inglês de <i>human immunodeficiency vírus</i>)	Vírus da imunodeficiência humana
ICB, USP Universidade de São Paulo	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
IFI IMT-SP Paulo	Imunofluorescência indireta Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
<i>ITS</i> (sigla em inglês de <i>Internal Transcriber Spacer</i>)	Espaçador interno transcrito
<i>kDNA</i> (sigla em inglês de <i>kinetoplast DNA</i>)	DNA de cinetoplasto
kDNA PCR k20-k22 <i>Leishmania</i> utilizando os oligonucleotídeos iniciadores K20 e K22.	PCR do gene do kDNA de <i>Leishmania</i>
kDNA PCR RV1-RV2 utilizando os oligonucleotídeos iniciadores K20 e K22.	PCR do gene do Kdna de <i>Leishmania</i>
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
MLEE (sigla em inglês de <i>Multi locus enzyme electrophoresis</i>)	Eletroforese de enzimas multilocus

MS	Ministério da Saúde
NNN	Meio de cultura Novy-Nicolle- McNeal
NCBI	Sigla em inglês de <i>National Center for</i>
<i>Biotechnology Information</i>	
PAHO	Sigla em inglês de <i>Pan American</i>
<i>Health Organization</i>	
PCR	Reação em cadeia da polimerase (sigla
em inglês de <i>Polymerase chain reaction</i>)	
PKDL	Lesão dérmica pós-kalazar (sigla em
inglês de Post-kala-azar dermal leishmaniasis)	
Pb	Pares de base
Pm	Peso molecular
RFLP	Polimorfismo de comprimento de
fragmentos de restrição (sigla em inglês de <i>Restriction fragment length</i>	
<i>polymorphism</i>)	
RNA	Ácido ribonucleico (sigla em inglês de
<i>ribonucleic acid</i>)	
rRNA	RNA ribossomal (sigla em inglês de
<i>ribonucleic acid</i>)	
Sb	Antimoniato de meglumina
SVS	Sistema de Vigilância em Saúde
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de
Notificação	
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TE	Tampão Tris- EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UV	Luz ultravioleta
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde/sigla
em inglês de <i>World Health Organization</i>	

UNIDADES DE MEDIDA

cm	centímetro
fg	fentograma
h	hora
Kg	quilograma
L	litro
m	metro
M	molar
mA	miliampere
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mol	moles
ng	nanograma
nm	nanomolar
pb	par de base
p	pico
s	segundo
U	unidade
V	volt
W	watt
$x\ g$	aceleração da gravidade ($\sim 9,8\ \text{m/s}^2$)
μL	microlitro
μM	micromolar
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
∞	infinito
%	porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
1.1 As leishmanioses	31
1.2 Leishmaniose visceral (LV) humana (LVH)	32
1.2.1 Tratamento da LV	32
1.2.2 Epidemiologia da LV	35
1.2.3 A leishmaniose visceral canina (LVC)	37
1.2.4 Formas evolutivas	38
1.2.5 Transmissão	38
1.2.6 Patogenia e ciclo	39
1.2.7 Manifestações clínicas da LVC	40
1.2.8 Manifestações clínicas da LVH	40
1.2.9 Diagnóstico da LVC	40
1.2.9.1 Diagnóstico parasitológico da LVC	41
1.2.9.2 Diagnóstico sorológico da LVC	41
1.2.9.3 Diagnóstico molecular da LVC	42
1.2.10 Diagnóstico da leishmaniose visceral humana (LVH)	42
1.2.10.1 Diagnóstico parasitológico da LVH	44
1.2.10.1.1 Esfregaço em lâmina (exame direto)	44
1.2.10.1.2 Cultura	45
1.2.10.2 Diagnóstico sorológico da LVH	45
1.2.10.2.1 Imunofluorescência	46
1.2.10.2.2 Testes imunocromatográficos	46
1.2.10.3 Diagnóstico molecular da LVH	47
1.2.10.3.1 DNA do cinetoplasto (k) de <i>Leishmania</i> (kDNA)	47
1.2.10.3.2 Espaçador transcrito interno do RNA ribossomal (ITS)	48

1.2.10.3.3 Diferenciação de espécies de <i>Leishmania</i>	49
1.2.9.3.3.1 Técnica de análise do polimorfismo de fragmentos por RFLP (do inglês Restriction fragment length polymorphism, cuja sigla é RFLP).....	50
2 JUSTIFICATIVA.....	52
3 OBJETIVOS.....	54
3.1 Objetivo geral.....	54
3.1.1 Objetivos específicos	54
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
4.1 Local do estudo e aspectos éticos	55
4.2 Cepas referência	55
4.3 Amostras biológicas	56
4.3.1 Grupo I - Amostras de pacientes com LV confirmada por exame clínico, epidemiológico, parasitológico e/ou sorológico.....	56
4.3.1.1 Critérios de inclusão.....	56
4.3.2 Grupo II - Amostras de indivíduos saudáveis (hígidos)	56
4.3.3 Grupo III – Amostras de pacientes com suspeita de leishmaniose visceral, sem a doença, porém com exame clínico sugestivo e/ou epidemiológico positivo.	57
4.3.4 Grupo IV - Amostras de pacientes com leishmaniose visceral confirmada por exame clínico, epidemiológico, parasitológico e/ou sorológico, e em tratamento.....	57
4.3.5 Grupo V – Amostras de cães com leishmaniose visceral confirmada por exame clínico e parasitológico.	57
4.3.6 Grupo VI - “Pool” de amostras de flebotomíneos infectados (<i>L.</i> <i>longipalpis</i>) com sangue de cão com leishmaniose visceral.....	57
4.3.7 Grupo VII – Amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar (LT)..	58
4.3.8 Grupo VIII – Amostras procedentes de diferentes patógenos para análise da especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores empregados no estudo.	58

4.4 Procedimentos: técnicas parasitológicas e sorológicas (métodos padrão-ouro)	60
4.4.1 Exame microscópico de esfregaço corado com o Panótico	60
4.4.2 Cultura em meio NNN suplementado com meio BHI	60
4.4.3 Teste imunocromatográfico (IrK39)	60
4.5 Análise de prontuários	61
4.6 Procedimentos: técnicas moleculares	61
4.6.1 Purificação das leishmânias em meio NNN-BHI para produzir controles positivos e para avaliar o limiar de detecção do ITS1 e do kDNA (kDNA PCR K20-K22)	61
4.6.2 Limiar de detecção em amostra sanguínea “batizada” com formas promastigotas de leishmânias - <i>L. (L.) chagasi</i>	61
4.6.3 Extração de DNA das amostras	62
4.6.4 Reação em Cadeia da Polimerase	62
4.6.4.1 PCR do gene constitutivo da beta-actina humana	62
4.6.4.2 ITS1 PCR	64
4.6.4.3 kDNA PCR	66
4.6.4.3.1 kDNA PCR com os oligonucleotídeos iniciadores K20 e K22 (kDNA PCR K20 - K22)	66
4.6.5 Corrida eletroforética	70
4.6.6 Técnica do polimorfismo por RFLP dos produtos da ITS1 PCR e kDNA PCR	70
4.6.7 Avaliação da sensibilidade dos oligonucleotídeos iniciadores	71
4.6.7.1 Avaliação da sensibilidade da ITS1 PCR	71
4.6.7.2 Avaliação da sensibilidade dos oligonucleotídeos iniciadores do kDNA:	
kDNA PCR K20-K22 e kDNA PCR RV1-RV2	71
4.6.8 Avaliação da especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores ITS 1 e kDNA	71

4.6.9 Análise de cepas referência de <i>L. (L.) infantum</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> em Sistema Automatizado de Eletroforese Capilar	71
4.6.10 Sequenciamento	72
4.6.10.1 Purificação.....	73
4.6.10.2 Reação de Sequenciamento e Precipitação	73
4.6.10.3 Análise do sequenciamento.....	74
4.7 Análise estatística	74
5 RESULTADOS	75
5.1 Análises moleculares	75
5.1.1 Análise da viabilidade do DNA das amostras, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores da beta-actina humana	75
5.1.2 Avaliação do limite de detecção dos ensaios moleculares: Sensibilidade analítica	75
5.1.2.1 Oligonucleotídeos iniciadores: ITS1 PCR – LITSR e L5.8S (ITS1 PCR) padronizada	75
5.1.2.2 Oligonucleotídeos iniciadores: kDNA PCR – K20 e K22	76
5.1.3 Resultados da PCR em amostras procedentes de diferentes patógenos (Grupo VIII): <i>Mycobacterium tuberculosis</i>, <i>Plasmodium falciparum</i>, <i>Trypanosoma cruzi</i>, <i>Trypanosoma brucei</i>, <i>Schistosoma mansoni</i>, (TG1) <i>Toxoplasma gondii</i> cepa ME49, (TG2), <i>Toxoplasma gondii</i> cepa RH, (TG3) <i>Toxoplasma gondii</i> cepa VEG e <i>Histoplasma capsulatum</i>, para análise da especificidade (amplificação inespecífica) dos oligonucleotídeos iniciadores: LITSR e L5.8S (ITS1 PCR), K20-K22 (kDNA PCR K20-K22) e RV1-RV2 (kDNA PCR RV1-RV2)	77
5.1.3.1 ITS1 PCR	77
5.1.3.2 kDNA PCR K20-K22	78
5.1.3.3 kDNA PCR RV1-RV2	78
5.1.4 Avaliação das cepas referência de <i>Leishmania</i> spp.	79

5.1.4.1 Técnica de análise do polimorfismo por RFLP, com a enzima de restrição Hae III, em cepas referência de <i>Leishmania</i> sp submetidas à ITS1 PCR (LITSR e L5.8S) – ITS1 PCR RFLP.....	79
5.1.4.2 Técnica de análise do polimorfismo por RFLP, com a enzima de restrição Hae III, em cepas referência de <i>Leishmania</i> sp submetidas à kDNA PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores K20 e K22 (kDNA PCR RFLP).....	81
5.1.4.3 Análise da kDNA PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores RV1 e RV2 (kDNA PCR RV1-RV2), utilizando cepas referência de <i>Leishmania</i> sp.....	82
5.1.5 Análise dos oligonucleotídeos iniciadores em amostras biológicas.....	83
5.1.5.1 Resultados em amostras de pacientes com leishmaniose visceral confirmada - Grupo I.	83
5.1.5.1.1 ITS1 PCR e ITS1 PCR RFLP.	83
5.1.5.1.2 kDNA PCR – oligonucleotídeos iniciadores K20 e K22 e kDNA PCR RFLP.	85
5.1.5.1.3 kDNA PCR – oligonucleotídeos iniciadores RV1 e RV2.....	86
5.1.5.2 Análise dos oligonucleotídeos iniciadores em amostras de indivíduos saudáveis - Grupo II.....	98
5.1.5.2.1 ITS1 PCR e kDNA PCR (K20 e K22 e RV1 e RV2)	98
5.1.5.3 Sensibilidade e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores: ITS1 PCR e kDNA PCR (K20 e K22 e RV1 e RV2).....	98
5.1.5.4 Resultados em 47 amostras de 47 pacientes com suspeita de LV, sem a doença, com exame clínico e/ou epidemiológico positivo - Grupo III.....	103
5.1.5.5 Análise dos oligonucleotídeos iniciadores em 16 amostras de 12 pacientes com LV e em tratamento – Grupo IV	103

5.1.5.6 Análise dos oligonucleotídeos iniciadores em 14 amostras biológicas de 14 cães com leishmaniose visceral confirmada por exame clínico e parasitológico – Grupo V.....	104
5.1.5.7 Análise dos oligonucleotídeos iniciadores em amostra de “pool” de flebotomíneos infectados com sangue de cão com leishmaniose visceral – Grupo VI.	107
5.1.5.8 Análise dos oligonucleotídeos iniciadores em 18 amostras de 18 pacientes com leishmaniose tegumentar (LT) – Grupo VII.....	109
5.1.5.8.1 ITS1 PCR e ITS1 PCR RFLP	109
5.1.5.8.2 kDNA PCR – kDNA PCR K20-K22.	109
5.1.5.8.3 kDNA PCR – kDNA PCR RV1-RV2.....	110
5.2 Análise de cepas referência de <i>L. (L.) chagasi</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> após ITS1 PCR, em Sistema Automatizado de Eletroforese Capilar-GelBot (Loccus Biotecnologia/Brasil).....	110
5.2.1 ITS1 PCR.....	111
5.2.2 ITS1 PCR RFLP.....	111
5.3 Sequenciamento.....	112
6 DISCUSSÃO.....	114
7. CONCLUSÃO	133
REFERÊNCIAS	135
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.	150
ANEXO B- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PROJETO FAPESP : 2010-50304-8.....	152
ANEXO C – ARTIGO PUBLICADO NO <i>JOURNAL OF PARASITOLOGY RESEARCH</i>.	156

1 INTRODUÇÃO

1.1 As leishmanioses

As leishmanioses representam um sério problema de saúde pública em todo o mundo, sendo reportadas nos 5 continentes e endêmicas em 98 países. Atualmente, 200 milhões de pessoas estão em situação de risco de contrair tais doenças. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que 300 000 casos de leishmaniose visceral (LV) e 1 000 000 de casos de leishmaniose tegumentar (LT) são registrados anualmente.¹ Dentre as doenças parasitárias, estão apenas atrás da malária em taxa de mortalidade, sendo a terceira maior causa de morbidade dentre as parasitoses. Integram a lista de doenças tropicais negligenciadas da OMS. Os processos migratórios e o aumento do número de viajantes têm contribuído para o aparecimento de casos de leishmanioses em regiões não endêmicas para tais doenças.² Essas moléstias são causadas por aproximadamente 21 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que pertencem à ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*.³ O gênero *Leishmania* possui dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania* aos quais pertencem diversas espécies.⁴ Segue **Quadro 1** com as informações das espécies de maior relevância no mundo, sua procedência e modalidade da doença pela qual são responsáveis:

Subgênero	Espécie	Procedência	Clínica
Leishmania	<i>L. (L.) major</i>	Ásia, África e Europa (Velho Mundo)	LT
	<i>L. (L.) tropica</i>		LT
	<i>L. (L.) aethiopica</i>		LT
	<i>L. (L.) infantum</i>		LT e LV
	<i>L. (L.) archibaldi</i>		LV
	<i>L. (L.) donovani</i>		LV e PKDL
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Américas e Oceania (Novo Mundo)	LT
	<i>L. (L.) infantum</i>		LT, PKDL e LT
	<i>L. (L.) mexicana</i>		LT
	<i>L. (L.) venezuelensis</i>		LT
Viannia	<i>L. (V.) braziliensis</i>		LT e LV
	<i>L. (V.) guyanensis</i>		LT
	<i>L. (V.) panamensis</i>		LT
	<i>L. (V.) peruviana</i>		LT
	<i>L. (V.) shawi</i>		LT
	<i>L. (V.) naiffi</i>		LT
	<i>L. (V.) lainsoni</i>		LT
	<i>L. (V.) lindenberg</i>		LT

Quadro 1 - Principais espécies causadoras de leishmanioses no mundo, etiologia, procedência e clínica, classificadas de acordo com subgênero.

Legenda: LV: leishmaniose visceral; PKDL: lesão dérmica pós-calazar; LT=leishmaniose tegumentar

Adaptado das referências ^{5,6,7,8,9,10, 11} do presente estudo.

1.2 Leishmaniose visceral (LV) humana (LVH)

A LV é uma doença que pode se apresentar como uma zoonose ou antroponose (calazar indiano) e atinge principalmente populações de baixa renda. ¹² É caracterizada pela sua cronicidade e capacidade de disseminação sistêmica. ¹³ Caso o tratamento específico não seja realizado, pode levar o paciente a óbito, atingindo níveis de letalidade que chegam a 10%. ^{14,15}

1.2.1 Tratamento da LV

Desde o ponto de partida, que se inicia com a utilização do tártaro emético pelo pesquisador brasileiro Gaspar Vianna, o tratamento da LV vem sendo amplamente estudado. ¹⁵ Os objetivos almejados com o tratamento da LV

contemplam a cura clínica da doença, bem como a diminuição da possibilidade de recidivas e da aquisição de resistência por parte das espécies de *Leishmania*. As opções por tratamentos de primeira e segunda linha variam em diferentes regiões do mundo, de acordo com a disponibilidade e eficácia do medicamento. A escolha do medicamento a ser utilizado para o tratamento da LVH deve levar em conta a toxicidade da droga escolhida.¹⁶

Segue **Quadro 2**, com resumo e adaptação do que é preconizado nas Américas para o tratamento da LV:

Clínica	Linha de tratamento	Medicamento	Dose	Duração do tratamento
Imunocompetentes com LV	Primeira linha	Anfotericina lipossomal	B 3 mg/kg/dia, durante 5 dias ou, 4 mg/kg/dia (infusão venosa, em uma dose diária)	7 dias
				5 dias
		Antimoniais pentavalentes	20mg de Sb+kg/dia	20-40 dias
	Segunda linha	Anfotericina desoxicolato	B 1,0 a 1,5 mg/kg/dia ou 3,0 mg/Kg/dia	21 dias
Coinfectados com <i>Leishmania</i> /HIV (LV)	Primeira linha	Anfotericina lipossomal	B 4mg/kg/dia	5 dias consecutivos mais dose única semanal por até 5 semanas
	Segunda linha	Antimoniais pentavalentes	20mg de Sb+kg/dia	30 dias
Lesão dérmica pós- kalazar*	Primeira linha	Anfotericina desoxicolato	B 1 mg/kg/dia	4 meses
Gestantes	Primeira linha	Anfotericina B	1 mg/Kg/ dia	14 dias

Referências.^{10,15}

*Informações acerca do que é feito no mundo, embora haja casos de PKDL na América, não há referência que mencione esquema terapêutico definido.

Quadro 2 - Medicamentos utilizados para o tratamento da LV nas Américas, dose recomendada e duração do tratamento em pacientes imunocompetentes, em coinfectados com *Leishmania*/HIV e pacientes com lesão dérmica pós kalazar*.

Apenas o medicamento Anfotericina B lipossomal é cedido pelo Ministério da Saúde para o tratamento das leishmanioses.¹⁰

Nas leishmanioses tegumentares, a duração do tratamento pode diferir da LV, podendo ser mais curta ou prolongada. Além disso, há diferenças entre os medicamentos utilizados e eficácia do tratamento, dependendo do agente etiológico ou da modalidade de LT.¹⁷

1.2.1 Coinfecção *Leishmania*/HIV

A susceptibilidade à LV está altamente relacionada com o aumento do número de casos da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV), e até o presente momento 35 países relatam casos de coinfecção *Leishmania*/HIV.¹⁸ A diversidade de manifestações clínicas pode ter representatividade na transmissão da doença, uma vez que os indivíduos podem corresponder a um sítio de infecção para o vetor.^{19,20}

Em coinfectados por *Leishmania*/HIV, há possibilidade de visceralização de espécies dermatópicas de *Leishmania*, como no relato de Silva et al., (2002)⁵ que descreveram caso de paciente procedente de Minas Gerais com leishmaniose causada por *L. (V.) braziliensis* encontrada em aspirado de medula óssea, que dentre outros sintomas apresentou febre e hepatoesplenomegalia.

A leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL) é uma complicação da LV, caracterizada pela presença de lesões maculares, maculopapulares e nodulares na pele de indivíduos tratados. É reportada principalmente na Índia e no Sudão, tendo como agente etiológico a *L. (L.) donovani*. Tal condição possui grande importância epidemiológica, uma vez que os parasitos podem estar presentes na pele do indivíduo e este pode agir como reservatório da doença. Embora não seja usualmente reportado, devido ao pequeno número de casos, a *L. (L.) infantum* também pode causar a PKDL. Foram relatados casos dessa modalidade em pacientes oriundos da Europa e da América do Sul, todos relacionados com a coinfecção pelo vírus HIV.^{21,22,23,24} No Brasil, Bittencourt et al., (2002),²⁵ relataram caso de paciente coinfectado com *Leishmania*/ HIV, procedente de Salvador, na Bahia, com suspeita de PKDL por *L. (L.) infantum* que apresentou exame histopatológico positivo para

Leishmania. Carnaúba Jr. et al., (2009), ²⁴descreveram caso de paciente procedente de Pernambuco, coinfetado com *Leishmania*/HIV com lesões similares à PKDL, nas quais foram encontrados parasitos mediante realização de biópsia, houve também positividade da PCR para o alvo kDNA. Trindade et al., (2015), ²⁶ apresentaram relato de caso de paciente procedente de Arapiraca, no Estado do Alagoas, que apresentou PKDL após tratamento de LV, com a presença de leishmânias em biópsia de pele. Tal quadro fora confirmado pela ITS1 PCR RFLP, com ausência de sintomas da LV e de parasitos no aspirado de medula óssea.

No entanto, em indivíduos imunocompetentes foi reportada tegumentarização de espécies viscerotrópicas, não somente restrito à *L. (L.) donovani*, ²⁷ como também descrito para *L. (L.) infantum* por Castro et al., (2016). ¹¹

1.2.2 Epidemiologia da LV

É infecção cosmopolita, que ocorre em 88 países, porém 90% dos casos estão concentrados em apenas seis deles: Bangladesh, Nepal, Índia, Sudão, Etiópia e Brasil. ^{28,29} Anualmente, a taxa de mortalidade no mundo é estimada em 40 000 a 50 000 óbitos. ³⁰

1.2.2.1 No Brasil

Nas Américas recebe a denominação de LV americana ou calazar neotropical e tem como agente etiológico a *L. (L.) infantum*, sinônimo de *L. (L.) chagasi*, que também está presente na região do Mediterrâneo (região sul da Europa e norte da África até o Irã), China, Sudão, e Etiópia. ²⁷ Essa doença é encontrada em 12 países da América Latina, no entanto, 90% dos casos ocorrem no Brasil. ²⁵ As primeiras evidências da LV na América do Sul são oriundas do estudo do médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas, ao descrever casos de pacientes com esplenomegalia sem causa justificada, no início do século passado. No entanto, apenas em meados de 1930 é que a doença revelou autoctonia e alta incidência no continente sul-americano. ²³

Inicialmente, essa infecção era considerada como uma doença de ocorrência predominantemente rural. Recentemente, ela vem se espalhando também para áreas urbanas, devido, principalmente, ao desflorestamento descontrolado, à migração dos habitantes de áreas rurais para as grandes cidades, à urbanização dos grandes centros, ao intenso fluxo de viajantes ao redor do mundo, à migração de indivíduos em decorrência de conflitos armados, à fácil adaptação do inseto vetor ao ambiente citadino e à presença de reservatórios caninos susceptíveis a infecção, que podem desenvolver alta parasitemia facilitando a disseminação de parasitos nos vetores. Além disso, o aumento do número de casos no mundo também está associado às imunodepressões que aumentam a susceptibilidade de indivíduos às doenças. Indivíduos coinfectados com *Leishmania* e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) desempenham um papel importante na epidemiologia do ciclo da LV, levando em conta sua transmissão em potencial para o vetor da doença.^{31,32}

A distribuição dessa doença no Brasil ocorre de maneira cíclica, com um aumento do número de casos em intervalos de cinco anos, valor que tende a variar entre os diferentes municípios e Estados, pois o perfil epidemiológico varia de acordo com as condições climáticas, geofísicas, biológicas e características sociais de cada localidade.³³ A LV humana ocorre nas cinco regiões brasileiras e 24 unidades federativas possuem casos registrados. Na região Sul do país foram registrados apenas casos esporádicos da doença no Paraná e no Rio Grande do Sul, em Santa Catarina são registrados casos de leishmaniose visceral canina (LVC). A região Nordeste apresenta o maior número de casos.^{34,35} O primeiro caso urbano dessa doença no Brasil foi registrado em 1986 na cidade de Teresina, Estado do Piauí. A partir daí vários outros casos de LV foram relatados na periferia de outras cidades como São Luiz (MA); Belo Horizonte (MG); Rio de Janeiro (RJ); Campo Grande e Corumbá (MS); Palmas (TO); Natal (RN); Aracajú (SE); Fortaleza (CE); Araçatuba e Bauru (SP); Feira de Santana (BA), entre outras.^{33, 36} De acordo com os dados analisados por Martins Melo et al., (2014),³⁰ no período correspondente aos anos 2000-2011, 3.322 mortes no Brasil foram relacionadas à LV, dos quais 2727 tiveram a LV como causa principal de morte, alcançando a média de 277 mortes/ano. Entre os anos 2009 e 2011 foi reportado que ao menos 251 municípios brasileiros apresentavam transmissão moderada ou intensa, dessa moléstia.³⁷ Em 2015 foram

notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net,³⁶ 3770 casos de LV confirmada em 22 das 27 unidades federativas. Os Estados com maior número de casos foram Maranhão (629), Ceará (502) e Minas Gerais (466). No entanto, o município com maior número de casos notificados foi Fortaleza, capital do Estado do Ceará. Dos 3770 casos, 288 enfermos evoluíram para óbito em decorrência dessa moléstia, dos quais 30 eram coinfectados pelo vírus HIV, de um total de 329 coinfectados. Entre os anos de 2009 e 2013 foram registrados 18 555 casos de LV e 1184 pacientes foram a óbito por LV, dos quais 124 eram indivíduos co-infectados pelo vírus HIV. O primeiro caso de transmissão humana da LV humana no Estado de São Paulo foi registrado em 1999, no município de Araçatuba.³⁸ No período entre 2010 e 2012, 18 municípios paulistas foram classificados com transmissão moderada ou intensa de LV humana.³⁷ Segundo Rangel et. al. (2013)³⁹ até o final de 2012, 105 municípios do Estado de São Paulo apresentaram transmissão de LV, dos quais 70 registraram transmissão humana e canina, 5 somente transmissão humana e 30 com transmissão canina, apenas. No ano de 2015, no Estado de São Paulo, foram notificados 130 casos distribuídos em 49 municípios, o município de Bauru apresentou o maior número de notificações, 23 em sua totalidade.³⁶ Em 2014 foram registrados 136 casos, dos quais 14 evoluíram para óbito.⁴⁰ Em 2015 foram registrados 12 óbitos.³⁶ Na região metropolitana de São Paulo, na qual está situado o município de São Paulo já foram registrados casos de LVC, porém sem casos humanos registrados.³⁸

1.2.3 A leishmaniose visceral canina (LVC)

A LVC é reportada em 50 países, sendo observada principalmente na América do Sul e na região do Mediterrâneo.⁴¹ (apud 42,43)

O cão doméstico constitui o principal reservatório dos agentes etiológicos da LV americana, pois é considerável foco de infecção para o agente transmissor. Sendo assim, os casos de leishmaniose canina precedem os humanos.⁴⁴ O risco de infecção do reservatório canino está estritamente relacionado às condições favoráveis para o vetor no ambiente habitado pelo cão. Portanto, o reservatório canino apresenta grande importância epidemiológica, uma vez que há correlação entre a

soroprevalência canina e a LV humana. Em regiões endêmicas, essa prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* no soro canino chega a variar de 3,4% a 40%.^{34, 45} No entanto, 80% dos cães com a doença canina são assintomáticos e, assim como os cães sintomáticos, podem infectar o vetor com leishmânias, porém, sua infecção pode passar despercebida devido à ausência de suspeita da doença.^{23,44} Além disso, é discutida ainda a possibilidade de transmissão sexual e vertical da LVC, o que torna ainda mais importante o controle dessa doença nessa população.²³ Em animais, a LV não é tratada, portanto, quando tal moléstia é diagnosticada, a eutanásia é recomendada, sendo considerada a linha de frente para controle da LV humana.^{14, 46} No entanto, especialistas afirmam que a simples remoção do animal não garante o controle da LV na localidade, até porque, a participação no ciclo zoonótico de indivíduos assintomáticos e de outros mamíferos que estejam em área urbana não pode ser excluída.^{40,43,47}

1.2.4 Formas evolutivas

Durante o seu ciclo evolutivo as leishmânias apresentam-se principalmente sob duas formas: a amastigota e a promastigota. A forma amastigota representa o estágio intracelular do parasito presente no hospedeiro vertebrado, sendo constituída por um núcleo grande e um cinetoplasto, que corresponde ao DNA mitocondrial. É a forma encontrada em órgãos do sistema mononuclear fagocitário.^{48,17} A forma promastigota, presente no hospedeiro invertebrado, é móvel e delgada, seu citoplasma é composto por núcleo, cinetoplasto e bolsa flagelar. É a forma encontrada em meio de culturas e no hospedeiro invertebrado.⁴⁹

1.2.5 Transmissão

A LV é transmitida pelo hospedeiro invertebrado da doença, mediante a picada de flebotomíneos fêmeas infectadas por *L. infantum*. A principal espécie incriminada na transmissão dessa doença no Brasil é a *Lutzomyia longipalpis*. O vetor da LV encontra-se adaptado às modificações realizadas pelo homem ao longo dos anos, o que o tornou apto a viver em ambientes rurais e urbanos. No entanto, a

ausência de espécies comumente responsáveis pela transmissão dessa moléstia em locais onde há LV, levantam suspeitas de que outras espécies possam apresentar capacidade vetorial para tal infecção.^{23, 46}

1.2.6 Patogenia e ciclo

O ciclo inicia-se a partir da inoculação de formas promastigotas metacíclicas, por um flebotomíneo fêmea infectado, em um mamífero suscetível, durante o repasto sanguíneo.⁴⁹ As leishmânias infectam os neutrófilos responsáveis pela defesa do sítio da picada do inseto e invadem as células do sistema fagocítico.¹⁷ A forma promastigota possui duas moléculas (gp63 e LPG) em sua superfície que são utilizadas em sua adesão às células fagocíticas do hospedeiro definitivo, uma vez que facilitam sua entrada nas células destes mamíferos infectados e permitem que o protozoário não seja destruído pelo mecanismo de fagocitose das células do SMF.⁵⁰ Dentro dos fagolisossomos, as leishmânias irão se transformar em amastigotas. As formas amastigotas irão se multiplicar até destruir essas células, ficando livres no meio extracelular até serem fagocitadas por outras células, dessa forma, disseminam-se para tecidos ricos em células do SMF. O ciclo se reinicia com a infecção de um novo vetor através do repasto sanguíneo.^{51,17}

Fonte: <http://dpd.cdc.gov/dpdx/html/Leishmaniasis.htm> (traduzido).

Figura 1 - Ciclo da leishmaniose visceral.

1.2.7 Manifestações clínicas da LVC

A LVC é uma doença complexa, que pode se manifestar de diversas maneiras, desde casos subclínicos até situações mais graves que ocasionam a morte do animal. A característica clínica é ampla, caracterizada por emagrecimento do animal, linfonodomegalia e dermatite esfoliativa como principais sintomas. Também podem ser observados lesões na pele não pruriginosas, onicocribose, esplenomegalia, hepatomegalia, ceratoconjuntivite, alopecia, edemas cutâneos ou na mucosa, eczemas no focinho ou nas orelhas, diminuição do apetite, lesões oculares, epistaxe, diarreia, glaucoma, uveíte, inchaço nas patas e corrimento no focinho.^{52,53,54}

1.2.8 Manifestações clínicas da LVH

Diante da predileção por macrófagos, uma vez no interior de tecidos ricos nessas células, as leishmânias poderão provocar no fígado e baço, hepatomegalia e esplenomegalia, respectivamente, acompanhadas de febre. Outros sintomas observados são a perda de peso, falta de apetite, fraqueza e tosse seca. Ao infectarem células da medula óssea, podem causar supressão do órgão, ocasionando no indivíduo a pancitopenia e imunodepressão, demonstrando a importância dessa infecção em pacientes com HIV, uma vez que se trata de infecção oportunista com amplo espectro de manifestações clínicas e de recorrente registro de casos de insucesso no tratamento.^{2,55} A gravidade das manifestações clínicas está relacionada com a idade, estado nutricional, características genéticas e imunológicas do indivíduo e clínica da infecção.⁵⁶

1.2.9 Diagnóstico da LVC

Em decorrência da possibilidade do intenso parasitismo cutâneo de cães infectados por *L. (L.) infantum* e da iminente capacidade de infecção aos vetores capacitados em transmitir a LV, o diagnóstico da LVC é de grande importância no cenário atual dessa infecção em localidades em que ela assume caráter zoonótico⁴¹ O

diagnóstico clínico dessa doença é uma tarefa árdua, uma vez que as manifestações apresentadas pelos cães possuem amplo espectro.⁵⁷

Assim como na LVH, a escolha da amostra é de suma importância para o diagnóstico da LVC, havendo predileção por amostra de aspirado esplênico frente ao aspirado de linfonodos, para o diagnóstico parasitológico e, por exemplo, utilização de secreção das conjuntivas e sangue para o diagnóstico molecular, sendo o último também utilizado para o diagnóstico sorológico.⁵⁶

1.2.9.1 Diagnóstico parasitológico da LVC

Os métodos parasitológicos são altamente específicos para o diagnóstico da LVC, no entanto, não são utilizados rotineiramente.²³ Tais métodos consistem na visualização de parasitos em esfregaço em lâmina ou cultura e serão descritos no item de diagnóstico da LV humana.

1.2.9.2 Diagnóstico sorológico da LVC

De acordo com informe técnico do Ministério da Saúde é recomendada a utilização de dois ensaios sorológicos para a definição de um caso de LVC, e são eles: teste rápido para triagem inicial, conhecido como DPP (fusão das proteínas rk39 e rk26) e ELISA para confirmação da doença.⁵⁸ De acordo com metanálise de Peixoto, de Oliveira & Romero (2015),⁴⁶ o ensaio ELISA com antígenos crus e o ensaio DPP possuem acurácia moderada, sendo necessários mais estudos para avaliar tais procedimentos. É sabido que cães assintomáticos podem apresentar resultados falso negativo ou falso positivo nos ensaios sorológicos.⁵⁹

A imunofluorescência indireta, anteriormente utilizada, embora apresentasse especificidade acima dos 90%, possuía sensibilidade baixa (cerca de 60%). A possibilidade de reações cruzadas com outros agentes infecciosos de cães, como a *Ehrlichia* e *Babesia*, deve ser salientada.⁴⁷

Os ensaios imunocromatográficos foram analisados em diversas publicações, e o teste utilizando apenas o antígeno recombinante k39, mostra ter sensibilidade e especificidade moderada em amostras caninas.^{46,60}

1.2.9.3 Diagnóstico molecular da LVC

Tal modalidade de diagnóstico pode ser empregada em uma grande variedade de amostras, que vai de biópsias de tecidos a material coletado de lesões oculares.⁶⁰ A prevalência da infecção por meio do diagnóstico molecular é muito maior do que o observado em ensaios sorológicos, ressaltando a importância da utilização destes métodos em estudos que visem o diagnóstico em amostras caninas. Além disso, estudos conduzidos com amostras caninas demonstraram que a presença das leishmânias pode ser detectada muito previamente ao aparecimento das manifestações clínicas e da soroconversão.⁴¹ Os ensaios de PCR quantitativa vêm sendo amplamente estudados em amostras caninas por apresentarem maior sensibilidade e especificidade do que a PCR convencional. Dada a possibilidade de casos de coinfeção com diversas espécies de *Leishmania*, de modalidades atípicas em que espécies de LT canina causam LVC, o diagnóstico molecular é imprescindível também na definição de muitos casos das espécies de *Leishmania* que infectam os vetores de LV e reservatórios dessa doença, principalmente os caninos.^{61,62,63}

1.2.10 Diagnóstico da leishmaniose visceral humana (LVH)

O diagnóstico clínico é, em certas ocasiões, suficiente para a definição de um caso suspeito. Em um caso clinicamente suspeito o paciente apresenta febre prolongada, que pode estar acompanhada de hepato ou esplenomegalia, emagrecimento, perda de apetite, tosse seca. Devido ao variável período de incubação, que pode durar de 10 dias a mais de um ano, deve ser dada a devida importância à análise completa do histórico do paciente, quanto a viagens para áreas endêmicas, ao uso de drogas injetáveis, etc., pois informações que são imprescindíveis para auxiliar na definição do caso suspeito podem ser ignoradas

erroneamente.⁵⁶ Alguns achados laboratoriais, como anemia, plaquetopenia, leucopenia, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia sugerem o diagnóstico da LV.¹³

No entanto, as manifestações clínicas podem ser confundidas com modalidades de outras doenças, tais como malária, tuberculose, toxoplasmose, esquistossomose mansônica, histoplasmose e salmonelose.¹⁵ Além disso, é sabido que o número de pacientes que desenvolvem infecção assintomática é maior do que os que apresentam sintomatologia.⁴

É preconizado que o diagnóstico da LVH seja baseado em aspectos clínicos e/ou epidemiológicos e laboratoriais.¹⁵

A precisão do diagnóstico laboratorial está estreitamente relacionada com a amostra colhida:

- O aspirado de baço constitui o exemplar no qual são encontradas maior concentração de parasitos, podendo apresentar sensibilidade de 93%. No entanto, por se tratar de método altamente invasivo, a colheita só pode ser realizada por profissionais altamente capacitados, não se excluindo o risco de ruptura do órgão e quadros hemorrágicos severos em consequência da punção.¹
- O aspirado de fígado dispõe de obtenção mais segura do que o aspirado de baço, porém, o encontro de parasitos só é possível em infecções que apresentem alta parasitemia.¹²
- O aspirado de medula óssea também é uma amostra de obtenção invasiva, colhida geralmente nas regiões da crista-ílica ou do osso externo. Constitui amostra de sensibilidade variável, cuja colheita é dolorosa ao paciente.^{23,56}

No Brasil, diante de um caso clínico suspeito, é preconizada a colheita de sangue para a realização dos testes sorológicos e punção aspirativa de medula óssea. Um caso clínico suspeito é definido como confirmado para LVH quando:

- há o encontro de parasitos nos ensaios parasitológicos;
- após a exclusão de diagnóstico de outra doença, a reação de imunofluorescência reagir com título de 80 ou mais;
- quando há positividade no teste imunocromatográfico;

- ou mediante avaliação de resposta ao tratamento pra LV. ¹⁶

O diagnóstico preciso e rápido da LVH é de suma importância, uma vez que essa doença pode ocasionar a morte do indivíduo infectado. Tal afirmação se torna mais importante ainda quando tal afecção for encontrada em indivíduos de países não endêmicos, que apresentam sintomatologia diversa.

1.2.10.1 Diagnóstico parasitológico da LVH

O diagnóstico parasitológico da LVH é altamente específico, pois consiste na observação do parasito por meio da visualização de esfregaço em lâmina contendo amastigotas, ou por observação da forma promastigota destes protozoários em meio de cultura do material biológico. Portanto, é considerado o método laboratorial padrão para a confirmação da doença, assim como na LVC, sendo o método mais confiável para o diagnóstico de pacientes que apresentam a coinfeção *Leishmania*/HIV, já que estes pacientes geralmente apresentam alta parasitemia. ^{64, 65} No entanto, a sensibilidade dessa metodologia é variável, podendo chegar a 60%, no máximo. ^{2,66}

1.2.10.1.1 Esfregaço em lâmina (exame direto)

É a demonstração direta do parasito em amostras provenientes da medula, baço, linfonodos ou sangue periférico. A partir destes materiais, lâminas são confeccionadas, coradas, e, posteriormente, analisadas por microscopia óptica, em busca de formas amastigotas que podem estar dentro ou fora das células. ⁶⁷

As lâminas confeccionadas a partir do material obtido da punção de medula óssea constituem o exame de primeira escolha, pois é o mais rápido, tem menos custo e é de fácil execução. Porém, exige que a análise seja realizada por um profissional experiente, considerando-se que contaminantes do corante, outros agentes infecciosos ou até mesmo plaquetas podem ser confundidas com formas amastigotas. Após a confecção do esfregaço em lâmina com o material obtido, é necessário fixá-lo com metanol e corá-lo pelas técnicas de Giemsa, Leishman ou equivalente. Após a secagem do material, esse deverá ser analisado à microscopia

óptica na objetiva de 100 vezes, com óleo de imersão. De acordo com o Manual de Controle e Vigilância da Leishmaniose Visceral no Estado de São Paulo, a leitura de ao menos 200 campos, em 5 a 6 lâminas, apresenta alto índice de positividade.⁶⁸

1.2.10.1.2 Cultura

Consiste na inoculação de alíquotas do material colhido, em meio de cultura bifásico. A demonstração do parasito na análise microscópica de aspirado de medula óssea ou esplênico cultivados em meio de cultura, também é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial da LV.¹⁹ As leishmânias apresentam ótimo crescimento em meios de cultura acelulares. O meio de Novy-MacNeal-Nicolle, conhecido como “meio de NNN” é o mais empregado. Ele é composto por uma base sólida, com ágar e sangue desfibrinado, mais uma fase líquida, que pode ser solução fisiológica, ou até mesmo o líquido de condensação formado durante o preparo do meio. O crescimento do parasito ocorrerá em condições de aerobiose, em temperaturas que variam de 22 a 26 °C, e nas leituras será possível encontrar as formas presentes ao longo do intestino dos flebotomíneos, ou seja, as formas promastigotas.⁶⁹ Trata-se de um método trabalhoso, de custo elevado e demorado para a obtenção de resultado, que leva, geralmente, um mês. As contaminações das culturas constituem um grande problema, além de outros fatores que podem contribuir para a baixa sensibilidade deste método.^{70,71}

1.2.10.2 Diagnóstico sorológico da LVH

Os métodos sorológicos são utilizados para diagnosticar as leishmanioses visceral e mucosa, doença onde há alta resposta humoral, e possuem baixo valor diagnóstico em leishmaniose cutânea. O diagnóstico sorológico dessa enfermidade tem grande valor em pacientes imunocompetentes e é baseado na resposta imune humoral.⁵⁴ No entanto, em indivíduos imunocomprometidos as provas sorológicas não são muito relevantes, uma vez que grande número desses pacientes não possui nível de anticorpos detectáveis para os testes em questão. Essa é uma limitação significativa de tais ensaios diagnósticos, diante da importância destes casos na

epidemiologia da LV. Os testes sorológicos são conhecidos por possuírem baixa sensibilidade em indivíduos coinfectados com *Leishmania*-HIV.^{55,65}

Alguns ensaios, como o ELISA, possuem sensibilidade e especificidade variável, dependendo do antígeno empregado.⁷² Além disso, em indivíduos tratados, os níveis de anticorpos permanecem em altos títulos, mesmo após a cura clínica.⁵⁴ Indivíduos saudáveis, sem histórico de infecção por *L. infantum*, residentes em área endêmica, podem apresentar títulos de anticorpos anti-*Leishmania* com uma soroprevalência que pode variar de <10% a > 30%.^{24,32} Há possibilidade de reações cruzadas com outros patógenos.^{73,74}

1.2.10.2.1 Imunofluorescência

É técnica baseada na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em plasma ou soro, mediante a utilização de anticorpos específicos e anticorpos secundários, conjugados por um corante fluorescente. Embora seja recomendada a utilização do teste da BioManguinhos (FIOCRUZ) pelo Ministério da Saúde do Brasil, tal ensaio é considerado positivo quando os títulos estão acima de 80, e quando um título de 40 é encontrado, deve-se solicitar a colheita de nova amostra.¹⁵ Além disso, neste ensaio há possibilidade de reação cruzada com tripanossomatídeos e fungos.⁷²

1.2.10.2.2 Testes imunocromatográficos

Os testes imunocromatográficos, da sigla em inglês ICT, são promissores e altamente adaptáveis ao diagnóstico de campo, uma vez que não necessitam de aparelhos sofisticados, são de fácil manuseio, podem ser utilizados em sangue, soro e plasma, e não precisam de um controle rigoroso de temperatura. Possuem alta sensibilidade, principalmente os que empregam o antígeno recombinante da proteína de 39 KDa, conhecido como rK39.^{24,72,75} Tal proteína é expressa principalmente por amastigotas de parasitos pertencentes ao complexo *L. (L.) donovani*. Sua sensibilidade varia de 97% a 100% e sua especificidade de 93% a 100%. No entanto, assim como outros testes sorológicos, pode ser positivo em indivíduos saudáveis oriundos de região endêmica, chegando a uma prevalência de quase 35% em

indivíduos assintomáticos procedentes de área endêmica, e não serve como controle de efetividade do tratamento por permanecer positivo por longos períodos após a cura clínica.⁵⁴

1.2.10.3 Diagnóstico molecular da LVH

Com o advento da biologia molecular e da obtenção de conhecimentos acerca do genoma de *Leishmania* foram desenvolvidos métodos sensíveis^{76, 77, 78, 79} e específicos^{26,80} para o diagnóstico de LV. Além disso, as técnicas moleculares são capazes de detectar recaídas e reinfecções em pacientes tratados⁸¹ e permitem a identificação das espécies de *Leishmania*.^{27,71} Tal informação é de suma importância, pois uma das recomendações do Ministério da Saúde é que, diante de um caso de coinfeção de *Leishmania*/HIV, ocorra a identificação de espécie devido à existência de espécies dermatrópicas de *Leishmania* que podem ocasionar visceralização e à possibilidade da espécie causadora de LV no Brasil ocasionar sintomas compatíveis com a doença tegumentar.^{10, 24, 26,82} Embora o Ministério da Saúde reconheça que estes ensaios sejam altamente sensíveis, eles não são recomendados para a definição do diagnóstico da LV, pois apresentam muitas variáveis, por exemplo, a diversidade de oligonucleotídeos iniciadores e as condições das reações. Porém, caso a infraestrutura de um laboratório seja compatível com a realização de ensaios moleculares, no caso da PCR, essa é recomendada em pacientes coinfectados por *Leishmania*/HIV, por apresentar alta sensibilidade e especificidade.¹⁵ Ainda sob o ponto de vista epidemiológico, é possível, mediante a utilização de técnicas moleculares, identificar espécies de *Leishmania* presentes no vetor e no reservatório canino da LV.^{83,84}

1.2.10.3.1 DNA do cinetoplasto (k) de *Leishmania* (kDNA)

O kDNA é uma estrutura do DNA mitocondrial disposta em círculos ligados covalentemente, presente nas células dos flagelados unicelulares pertencentes à família *Trypanosomatidae*, ordem Kinetoplastida. *In vivo*, a estrutura do kDNA, constituída por maxi e minicírculos, é altamente condensada e tem a forma de discos.

Os maxicírculos (20-35 kb), presentes em 20-50 cópias por cinetoplasto, são responsáveis pela codificação do RNA ribossomal/rRNA e de proteínas mitocondriais. Os minicírculos (0,5-1,5 kb) estão presentes em cerca de 10^4 cópias por célula de *Leishmania*, sendo, por isso, os alvos preferenciais no kDNA, o que possibilita a utilização de amostras biológicas contendo pequenas quantidades de DNA do parasito.^{85,86} Todos os membros da família *Trypanosomatidae* possuem kDNA contendo minicírculos organizados por um sistema que contém regiões com elevado grau de polimorfismo, juntamente com regiões conservadas, o que permite, em alguns casos, a sua utilização para fins taxonômicos e genéticos.^{6, 87} No entanto, alguns iniciadores não têm demonstrado a capacidade de diferenciar espécies de *Leishmania*, como no estudo de Trindade et al., (2015),²⁶ no qual utilizaram os iniciadores degenerados dos minicírculos do kDNA, chamados K20 e K22, padronizados pelos autores para a detecção do gênero *Leishmania*. Alguns autores optaram pela técnica de análise de polimorfismos de produtos da kDNA PCR com iniciadores degenerados, de sequência similar ao do K20 e K22.^{88, 89, 90, 91} Portanto, o kDNA é mais amplamente utilizado na detecção de *Leishmania* spp ou ainda na identificação de diferentes subgêneros.^{78, 88} Alguns estudos utilizam os oligonucleotídeos iniciadores do kDNA, RV1 e RV2, cujos alvos estão localizados na região LT1 dos minicírculos do complexo de *L. (L.) donovani*, para a amplificação específica de *L. (L.) infantum*.^{24,59}

1.2.10.3.2 Espaçador transcrito interno do RNA ribossomal (ITS)

A região do espaçador transcrito interno (ITS) separa os sítios 18 S (genes da subunidade menor) e 26 S (genes da subunidade maior), incluindo duas regiões: o ITS1 e o ITS2 do RNA ribossomal (rRNA), e a sequência codificante 5.8S.⁹³ Por ser pouco conservada, a região ITS, ou espaçador transcrito interno do RNA ribossomal, é adequada para a caracterização de organismos filogeneticamente próximos, como as diferentes espécies de um mesmo gênero.^{94, 95} A região 5.8S é uma região consideravelmente pequena e bastante conservada.⁹³ Foram observadas muitas variações intra e interespecíficas na região do RNA ribossomal do ITS1 e ITS2 entre as espécies de *Leishmania* presentes no Velho e no Novo Mundo, e

acredita-se que essas sequências sejam homogêneas entre uma mesma espécie deste protozoário.^{96,97}

Fonte: Manual of Molecular Procedures, Instituto Oswaldo Cruz

Figura 2 - Região ITS1 e ITS2 de *Leishmania* spp.

O complexo *L. donovani* possui o menor grau de polimorfismos das sequências de ITS quando comparado a outros complexos de *Leishmania*, o que auxilia em sua diferenciação.⁹⁸ A região ITS1 está localizada entre os genes 18S e 5.8 S do RNA ribossomal. Este local possui sequências conservadas, que possibilitam sua utilização como alvo da reação de PCR, e polimorfismos, que facilitam a identificação de espécies que são relevantes para o diagnóstico diferencial.^{99, 100} O ITS1 é amplamente estudado no Velho Mundo para identificação de espécies, associado à utilização de enzimas de restrição, principalmente na região do Mediterrâneo, onde a LV tem por agente etiológico a *L. (L.) infantum*, e na investigação de pacientes com LT.^{101,102,103} Estima-se que existam de 20 a 200 cópias deste gene em cada genoma de *Leishmania*.¹⁰⁵ Nas condições estabelecidas por Schönian et al.(2003),⁸⁰ essa sequência pode detectar até aproximadamente 0.2 parasitos por amostra (5µl).

1.2.10.3.3 Diferenciação de espécies de *Leishmania*

A diferenciação de espécies de *Leishmania* é de extrema importância para o correto diagnóstico e prognóstico da doença, e é imprescindível na escolha do tratamento a ser adotado, especialmente em locais onde há coinfeções causadas por mais de uma espécie de *Leishmania*, tendo grande valor sob o ponto de vista

epidemiológico. Populações do parasito que possuem padrões de enzimas em comum são conhecidas como zimodemos.⁴ A análise de isoenzimas, conhecida como eletroforese de enzimas multilocus, da sigla em inglês MLEE, é considerada padrão-ouro para a identificação de espécies.^{82,106} Consiste em um ensaio bioquímico que avalia padrões de diferentes enzimas em gel de agarose, apontando similaridades e diferenças entre as espécies de *Leishmania* mediante comparação aos perfis obtidos para as cepas padrão da Organização Mundial da Saúde.^{88,107}

As técnicas moleculares têm demonstrado grande importância na identificação de espécies associadas ao diagnóstico das leishmanioses.¹⁰³ Os alvos da região do cinetoplasto (kDNA) ou da subunidade menor do RNA ribossomal de *Leishmania*, embora estejam presentes em maior quantidade nas células dos parasitos, inferindo-se que sejam mais sensíveis, identificam apenas os parasitos ao nível de gênero ou subgênero. No entanto, torna-se importante a utilização de ensaios gênero-específicos e espécie-específicos, com o objetivo de se evitar resultados falso-negativos e falso-positivos, e identificar coinfeções com outras espécies de *Leishmania*, ou ainda, detectar modalidades incomuns devido à *L. (L.) infantum*, como por exemplo a PKDL.^{26,108}

1.2.9.3.3.1 Técnica de análise do polimorfismo de fragmentos por RFLP (do inglês Restriction fragment length polymorphism, cuja sigla é RFLP).

A técnica de análise do polimorfismo de fragmentos por RFLP consiste na utilização de enzimas de restrição em um determinado alvo, na intenção de clivar sequências de material genético que possibilitam a diferenciação do alvo em questão, diante de outras sequências. A identificação de espécies pelo uso de enzimas de restrição é menos trabalhosa e mais barata do que a eletroforese de isoenzimas.^{88,96,108, 109,} A amplificação com sequências de oligonucleotídeos iniciadores consideradas espécie-específicas possui algumas limitações, caso não seja combinada com um ensaio gênero-específico para eliminar a possibilidade de resultados falso-negativos e identificar coinfeções com outras espécies de *Leishmania*.

A PCR RFLP do espaçador transcrito interno 1 (ITS 1) é a técnica mais amplamente utilizada para a detecção e identificação de espécies no Velho Mundo.¹⁰³

A digestão dos produtos da ITS1 PCR é realizada apenas com uma enzima, a *Hae* III, que possibilita a distinção da maioria dos parasitos de *Leishmania* que possuem relevância médica.^{80, 108} A enzima *Hae* III reconhece sítios que apresentem a sequência GG↓CC, gerando fragmentos com extremidades cegas.

A ITS1 PCR RFLP pode ser utilizada na identificação de parasitos nos tecidos, sangue ou outras amostras, sem prévia inoculação em meio de cultura, análise microscópica ou qualquer outra técnica.¹⁰¹

2 JUSTIFICATIVA

A partir de projeto financiado pela FAPESP, conduzido no Laboratório de Parasitologia do IMT-USP, amostras de pacientes internados no complexo HCFMUSP, procedentes de áreas endêmicas com suspeita de leishmaniose visceral (LV), foram analisadas quanto à positividade na pesquisa do kDNA-PCR, tendo como referência os resultados dos exames parasitológicos, realizados em aspirado de medula óssea e em sangue periférico, dos testes sorológicos, além de dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes. As técnicas parasitológicas realizadas foram o exame microscópico de esfregaço em lâmina corado com o Panótico e o de cultura em meio NNN-BHI, e o teste imunocromatográfico, IrK39, representando o exame sorológico. Os testes foram complementados com análise molecular, pela PCR, tendo como alvo o kDNA (K20/K22) (*Leishmania* spp). Este último permitiu que identificássemos ao nível de gênero, exatamente a proposta inicial, que era também a de que diagnosticássemos a partir de amostras sanguíneas, com o objetivo de minimizar procedimentos invasivos e dolorosos para o paciente durante o diagnóstico da LV. Além disso, a detecção do DNA do parasito permitiu definir a doença em atividade, diferentemente dos testes sorológicos. Cumprida essa etapa, detectamos a necessidade de propor um algoritmo molecular para o diagnóstico da LV, com o objetivo de responder à seguinte questão: “É com certeza a *L. (Leishmania) infantum* a responsável pelos casos diagnosticados como leishmaniose visceral?” Diante disso, decidimos pela padronização de outro alvo molecular espécie-específico denominado ITS1,⁸⁰ utilizando os oligonucleotídeos iniciadores LITSR e L5.8S do espaçador interno transcrito do RNA ribossomal, amplamente utilizado para a detecção do gênero *Leishmania* e identificação de espécies, mediante a utilização da técnica de análise de polimorfismos que utiliza enzima de restrição. Tal alvo está localizado na região ITS, composta por regiões altamente conservadas, o que permite sua utilização como alvo da PCR possibilitando o diagnóstico de leishmanioses, e também por regiões pouco conservadas, garantindo maior grau de polimorfismos, fornecendo a identificação de organismos filogeneticamente próximos com auxílio de ferramentas como a restrição por enzimas.⁹⁹ Para tanto, em seguida à amplificação, realizamos a digestão enzimática (RFLP) para elucidação da espécie responsável pela enfermidade, auxiliando o corpo clínico no que tange ao tratamento

e complementando estudos epidemiológicos. Como forma de implementar ainda mais as técnicas moleculares, decidimos também pela análise dos oligonucleotídeos iniciadores RV1 e RV2, que amplificam uma região mitocondrial do parasito, já padronizados pela equipe do IAL. Desse modo, poderíamos complementar o estudo, que inicialmente destacou uma técnica menos invasiva voltada ao diagnóstico de gênero a partir de amostras sanguíneas, propondo um algoritmo para o processamento das amostras e um diagnóstico molecular robusto da leishmaniose visceral.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Obter um algoritmo de processamento das amostras de pacientes para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral ao nível de espécie.

3.1.1 Objetivos específicos

Padronizar e validar a técnica de PCR tendo como alvo o ITS1, o espaçador interno transcrito do RNA ribossomal, mediante a análise de amostras positivas e negativas para essa doença.

Comparar a sensibilidade e especificidade do ITS1 PCR com os alvos do kDNA: os oligonucleotídeos iniciadores K20 e K22 e RV1 e RV2.

Padronizar e validar a técnica de ITS1 PCR RFLP para a definição espécie-específica do agente etiológico da leishmaniose visceral, mediante o exame de culturas de *L. (L.) infantum* e a análise de amostras com positividade confirmada para essa doença.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do estudo e aspectos éticos

O estudo foi conduzido no Laboratório de Investigação Médica – Parasitologia Médica (LIM 46) e no Laboratório de Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. Essa pesquisa recebeu a aprovação da Comissão para Análises de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), cujo número de parecer é o 191.806, e o de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética é o 07859712.0.0000.00.68.

4.2 Cepas referência

As cepas referência de *Leishmania* spp utilizadas estão apresentadas na **Tabela 1**:

Tabela 1 - Espécies de *Leishmania* e número do código internacional das cepas empregadas.

Espécie de <i>Leishmania</i>	Código internacional
<i>L. (L.) chagasi</i>	MHOM/BR/72/strain46
<i>L.(L.) chagasi</i>	MHOM/BR/81/M6445
<i>L.(L.) amazonensis</i>	MHOM/BR/1973/M2269
<i>L.(L.) donovani</i>	MHOM/IN/80/DD8
<i>L.(L.) major</i>	MHOM/1L /80/ Friedlin
<i>L.(V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M2903
<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1975/ M4147
<i>L.(V.) shawi</i>	MHOM/BR/2001/M19672
<i>L.(V.) lainsoni</i>	MHOM/BR/81/M6426
<i>L. (V.) naiffi</i>	MDAS/BR/79/M5533

As cepas foram cedidas pelos seguintes Laboratórios: Soroepidemiologia-IMT, Patologia - FMUSP, Fisiologia dos Tripanossomatídeos- Instituto de

Biociências (IB) – USP e pelo Núcleo de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz (IAL).

4.3 Amostras biológicas

A seguir, apresentamos descrição detalhada de cada um dos oito grupos de amostras:

4.3.1 Grupo I - Amostras de pacientes com LV confirmada por exame clínico, epidemiológico, parasitológico e/ou sorológico.

Fizeram parte deste grupo amostras sanguíneas e/ou de aspirado de medula óssea, colhidas em EDTA, de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), provenientes de biorrepositório de estudo financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP), cujo protocolo é 2010-50304-8, e amostras de pacientes cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares da Universidade do Mato Grosso do Sul (UFMS), em trabalho de colaboração.

4.3.1.1 Critérios de inclusão

Foram analisadas 82 amostras procedentes de 73 pacientes, oriundos de área endêmica, portanto, epidemiologicamente positivos e/ou com dados compatíveis clinicamente ou laboratorialmente com a leishmaniose visceral (LV). Os exames parasitológicos e sorológicos (padrão-ouro), respectivamente, confirmaram a positividade em aspirado de medula óssea ou sangue periférico, nos exames de esfregaço em lâmina e/ou cultura, e/ou por meio do ITLEISH® ou Kalazar Detect.

4.3.2 Grupo II - Amostras de indivíduos saudáveis (hígidos)

Fizeram parte deste grupo 30 amostras sanguíneas procedentes de 30 doadores de sangue do HCFMUSP cedidos pelo Departamento de Biologia Molecular, Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, oriundas de projeto

cujo número de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética é CAAE 39278514.8.0000.0065

4.3.3 Grupo III – Amostras de pacientes com suspeita de leishmaniose visceral, sem a doença, porém com exame clínico sugestivo e/ou epidemiológico positivo.

Fizeram parte deste grupo 47 amostras sanguíneas e/ou de aspirado de medula óssea procedentes de 47 pacientes sem a doença, porém com exame clínico sugestivo e/ou epidemiológico positivo.

4.3.4 Grupo IV - Amostras de pacientes com leishmaniose visceral confirmada por exame clínico, epidemiológico, parasitológico e/ou sorológico, e em tratamento.

Foram analisadas 16 amostras oriundas de 13 de pacientes em tratamento para LV.

4.3.5 Grupo V – Amostras de cães com leishmaniose visceral confirmada por exame clínico e parasitológico.

Foram analisadas 14 amostras de aspirado de medula de cães, procedentes do Estado do Piauí, com LV confirmada mediante exame clínico e testes parasitológicos. As amostras foram cedidas pelo Laboratório de Soroepidemiologia do IMT-USP (Comissão de Pesquisa e Ética, processo 2010/077).

4.3.6 Grupo VI - “Pool” de amostras de flebotomíneos infectados (*L. longipalpis*) com sangue de cão com leishmaniose visceral.

Foi analisado um “pool” de amostras de flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* artificialmente infectados em laboratório, mediante a exposição de cão com LVC à sua picada.

4.3.7 Grupo VII – Amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar (LT).

Foram obtidas 18 amostras sanguíneas de 18 pacientes atendidos no complexo do HCFMUSP com LT confirmada, mediante análise clínica associada a testes parasitológicos de raspado de pele ou biópsia.

4.3.8 Grupo VIII – Amostras procedentes de diferentes patógenos para análise da especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores empregados no estudo.

Foram obtidas 9 amostras de diferentes patógenos que necessitam de diagnóstico diferencial de LV e LT, e 6 amostras de pacientes chagásicos. As amostras dos patógenos pertencentes a este grupo estão descritas a seguir, com a justificativa de sua inserção para análise.

- ***T. cruzi*:** *T. cruzi* e *Leishmania* sp possuem proximidade filogenética e apresentam prevalência nas mesmas áreas geográficas.⁸⁷ Foram analisadas 6 amostras de pacientes com doença de Chagas confirmada e 1 amostra de cepa Y de *T. cruzi*, proveniente de material isolado de sangue de camundongo infectado.
- ***T. brucei*:** apresenta proximidade filogenética com *Leishmania* sp, e ainda que não ocorra no Brasil, pode ser eventualmente encontrado em viajantes.⁸⁷ Foi analisada amostra de cultura de *T. brucei*.
- ***Mycobacterium tuberculosis*:** pode ocasionar a tuberculose miliar, que causa no paciente, febre, fraqueza e perda de peso, sintomatologias que podem ser confundidas com a LV.¹¹⁰ Foi analisada amostra de DNA plasmidial de *M. tuberculosis* procedente de kit de PCR em tempo real (COBAS® TaqMan® MTB Test/USA).
- ***Toxoplasma gondii*:** pacientes com toxoplasmose disseminada podem apresentar, dentre outros sintomas, febre e hepatoesplenomegalia. Foram analisadas amostras provenientes de material isolado de sangue de

camundongo infectado com as cepas ME49 (1 amostra), RH (1 amostra) e VEG (1 amostra) de *T. gondii*.⁶⁸

- ***Plasmodium falciparum***: pacientes com malária podem apresentar febre, hepatomegalia e anemia, havendo necessidade do diagnóstico diferencial com LV. Em algumas regiões do Brasil, a leishmaniose e a malária são endêmicas.⁶⁸ Amostra proveniente de paciente com malária causada por *P. falciparum* foi analisada nessa etapa.
- ***Histoplasma capsulatum***: amostra deste fungo foi incluída, já que na clínica da histoplasmose disseminada o paciente pode evoluir para hepatoesplenomegalia, febre alta e perda de peso.⁶³ Foi analisada amostra procedente de cultura de *H. capsulatum*.
- ***Schistosoma mansoni***: pacientes com esquistossomose mansônica podem evoluir para hepatomegalia ou hepatoesplenomegalia. Tal doença ainda é considerada um problema de saúde pública no Brasil, mesmo na vigência de programa de controle.¹¹¹ Foi analisado DNA procedente de parasito adulto.

Cada um dos oito grupos de amostras analisados nos testes moleculares empregados são descritos na **Tabela 2**:

Tabela 2 - Descrição dos grupos com menção ao número de amostras, de pacientes, de animais e de patógenos analisados nos testes moleculares empregados.

Grupo	Número total de amostras	Pacientes	Animais	Patógenos
Grupo I	82	73	-	-
Grupo II	30	30	-	-
Grupo III	47	47	-	-
Grupo IV	16	16	-	-
Grupo V	14	-	14	-
Grupo VI	1	-	1	-
Grupo VII	18	18	-	-
Grupo VIII	15			15

4.4 Procedimentos: técnicas parasitológicas e sorológicas (métodos padrão-ouro)

4.4.1 Exame microscópico de esfregaço corado com o Panótico

Tal exame foi realizado nas amostras dos pacientes dos grupos I, III e IV. Foram confeccionados esfregaços a partir de 5 µL de amostra (aspirado de medula óssea e/ou sangue periférico) em duas lâminas, obtendo-se uma extensão sanguínea delgada e uniforme. As lâminas foram coradas com o corante Panótico (Newprov/Brasil), de acordo com o protocolo do fabricante. As lâminas foram analisadas em microscópio, na objetiva de imersão (100 vezes), para a procura de formas amastigotas intra e/ou extracelulares, em toda a extensão da lâmina, por aproximadamente 60 minutos.

4.4.2 Cultura em meio NNN suplementado com meio BHI

Para a cultura foram inoculados 40 µL de amostra (aspirado de medula óssea e/ou sangue periférico) em tubos contendo meio NNN (DIFCO-EUA) aos quais foram adicionados 2 mL de meio BHI (DIFCO-EUA). Os tubos foram armazenados em estufa BOD (Eletrolab-Brasil), à temperatura de 25°C, e as amostras foram analisadas em microscópio óptico, na objetiva de 40 vezes, à procura de formas promastigotas, semanalmente, durante trinta dias.

4.4.3 Teste imunocromatográfico (IrK39)

As amostras de sangue, plasma ou aspirado de medula foram analisadas mediante a utilização de teste rápido imunocromatográfico (IrK39) - IT LEISH® (Biorad / DiaMed AG Suíça) ou Kalazar Detect (Inbios / EUA), de acordo com os protocolos pré-estabelecidos pelos fabricantes.

4.5 Análise de prontuários

Foram analisados, previamente e no decorrer do estudo, prontuários médicos, mediante devida autorização, junto ao complexo HCFMUSP e UFMS, dos pacientes presentes nos Grupos I, III, IV, VII e VIII, em busca de dados que pudessem complementar os resultados encontrados.

4.6 Procedimentos: técnicas moleculares

4.6.1 Purificação das leishmânias em meio NNN-BHI para produzir controles positivos e para avaliar o limiar de detecção do ITS1 e do kDNA (kDNA PCR K20-K22)

Para a obtenção de controles positivos para as reações de PCR empregadas foi utilizada amostra referência de culturas de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/72/strain46) mantida em meio bifásico NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) e BHI (Brain Heart Infusion), a 27° C, em estufa BOD. A contagem de parasitos foi realizada em câmara de Neubauer. Posteriormente, 1mL do meio contendo as formas promastigotas foi centrifugado a 1800x g, por 10 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e procedeu-se com 3 lavagens do meio, adicionando-se ao *pellet* 250µL de solução salina a 9% com posterior centrifugação. Por fim, foi adicionado ao pellet 300 µL de solução salina a 9% ou o volume necessário para seguir com a extração de acordo com o protocolo do Qiaamp DNA Mini Kit 250 (Qiagen/ Alemanha) para sangue fresco.

4.6.2 Limiar de detecção em amostra sanguínea “batizada” com formas promastigotas de leishmânias - *L. (L.) chagasi*

Amostra de sangue periférico de doador voluntário saudável foi cedida e aliquotada em 180 µL em 10 microtubos. Procedeu-se com a adição e subsequente diluição seriada de amostra de DNA de promastigotas de *L.*

(*L. chagasi* (MHOM/BR/72/strain46) extraída, partindo-se de 10^{-5} até 10^{-3} parasitos por mL, com posterior extração de DNA de cada tubo. As reações de PCR nessas amostras foram realizadas para os alvos ITS1 e kDNA (oligonucleotídeos iniciadores K20 e K22), que serão descritos posteriormente.

4.6.3 Extração de DNA das amostras

A extração de DNA das amostras foi realizada de acordo com o protocolo do Qiaamp DNA Mini Kit 250 (Qiagen/ Alemanha) para sangue fresco, partindo-se de volume inicial de 200 μ L de sangue. A dosagem de DNA extraído foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop, ThermoScientific/USA) com leituras em 260 e 280 nm. O material extraído foi devidamente identificado e armazenado a -20°C , até o momento da amplificação.

4.6.4 Reação em Cadeia da Polimerase

Para a realização da PCR foram adotadas medidas para a minimização de riscos de contaminação, tais como: uso de áreas de trabalho separadas (sala de extração, sala de reagentes e sala de amplificação) e com o fluxo direcionado do local com menos agentes contaminantes para o local com mais agentes contaminantes. Foram utilizadas ponteiras com filtro e o material pertencente a cada área foi individualizado.

Todas as sequências de nucleotídeos utilizados foram submetidas à análise no BLAST (NCBI).

4.6.4.1 PCR do gene constitutivo da beta-actina humana

Para avaliação da viabilidade do DNA contido nas amostras de pacientes e animais, elas foram submetidas à PCR do gene constitutivo da beta-actina utilizando-se os iniciadores B1 e B2 e as condições descritas na **Tabela 3**, respectivamente.

Tabela 3 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores da beta-actina, peso molecular do fragmento amplificado, artigo referência e condições da PCR para a beta-actina.

Gene alvo	Iniciadores	Pm do fragmento amplificado	Artigo referência	Concentração e volume da amostra	Concentração dos reagentes (volume final da reação= 20 µL)	Temperaturas (°C) e tempo de ciclagem (s)	Número de ciclos (MJ Research/USA).
Gene constitutivo da beta-actina humana	B1:GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA B2 :CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT	540 pares de base	Rodriguez et al., 2001 ¹¹²	100 ng; 2-4 µL	1x Tampão da enzima 0,2 mM de dNTP's(Fermentas,Thermo Fischer, Ontário,Canadá) 1,5 mM de MgCl ₂ (Fermentas,Thermo Fischer, Ontário,Canadá) 0,4 µM de cada oligonucleotídeo(IDT,Sinapse Biotecnologia, Califórnia, EUA) 2 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas,Thermo Fischer, Ontário,Canadá)	Desnaturação inicial: 95°C; 120 s Desnaturação: 95°C; 20 s Anelamento: 53°C; 30 s Extensão: 72°C; 60s Extensão final: 72°C; 360 s	35

Legenda:ng=nanogramas °C= graus centígrados ;s=segundos.

4.6.4.2 ITS1 PCR

Para a realização da reação da ITS1 PCR foram utilizados os iniciadores LITSR e L5.8S, nas condições descritas por Schönian et al., (2003), com temperatura de anelamento de 53°C e concentração de 1,5 mM de MgCl₂, e “nested” PCR em amostras cuja primeira reação foi negativa. Observada a baixa sensibilidade em algumas amostras de pacientes com LV, foi necessária padronização, na tentativa de aumentar a sensibilidade da reação. Com gradientes de temperatura de anelamento, representados pelos diferentes protocolos partindo-se de 39 °C até 53 °C e testes com a concentração de cloreto de magnésio que variaram de 1,5 mM⁸⁰ a 4 mM,¹¹³ analisamos 4 amostras de pacientes com LV confirmada, em cepa de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445) e na cepa Y de *T. cruzi*.

Após os testes iniciais a reação foi devidamente padronizada e as condições descritas na **Tabela 4**, foram utilizadas:

Tabela 4 - Descrição dos iniciadores ITS1 PCR, peso molecular do fragmento amplificado, artigo referência e condições da ITS1 PCR padronizada.

Gene alvo	Iniciadores	Pm do fragmento amplificado	Artigo referência	Concentração e volume da amostra	Concentração dos reagentes (volume final da reação= 50 µL)	Temperaturas (°C) de ciclagem e tempo de ciclagem (s)	Número de ciclos (MJ Research/USA).
rRNA de <i>Leishmania</i> spp	LITSR: CTGGATCATTTTCCG ATG L5.8S: TGATACCACTT ATCGCACTT	320 pares de base	Schönian et al., 2003 ⁸⁰	200 ng; 2-20 µL	1x Tampão da enzima 0,2 mM de dNTP's (Fermentas, Thermo Fischer, Ontário, Canadá) 4 mM de MgCl ₂ (Fermentas, Thermo Fischer, Ontário, Canadá) 400 nM de cada oligonucleotídeo (IDT, Sinapse Biotecnologia, Califórnia, EUA) 2 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas, Thermo Fischer, Ontário, Canadá)	Desnaturação inicial: 95°C; 360 s Desnaturação: 95°C; 20 s Anelamento: 53°C; 30 s Extensão: 72°C; 60s Extensão final: 72°C; 360 s	40

Legenda: ng=nanogramas; rRNA= RNA ribossomal de *Leishmania* spp; Pm=peso molecular; °C= graus centígrados ;s=segundos.

4.6.4.3 kDNA PCR

4.6.4.3.1 kDNA PCR com os oligonucleotídeos iniciadores K20 e K22 (kDNA PCR K20 - K22)

Diante da possibilidade de emprego da técnica de análise de polimorfismos de fragmentos por RFLP da kDNA PCR K20-K22, já padronizada, e na tentativa de elucidar casos não definidos pela ITS1 PCR RFLP, decidimos realizar a kDNA PCR K20-K22, cujas condições estão descritas na **Tabela 5**, para posterior realização de kDNA PCR RFLP.

Tabela 5 - Descrição dos iniciadores da kDNA PCR, peso molecular do fragmento amplificado, artigo referência e condições da kDNA PCR K20-K22.

Gene alvo	Iniciadores degenerados	Peso molecular do fragmento amplificado	Artigo referência	Concentração e volume da amostra	Concentração dos reagentes (volume final da reação= 40 µL)	Temperaturas (°C) de ciclagem e tempo de ciclagem (s)	Número de ciclos (MJ Research/USA).
kDNA de <i>Leishmania</i> spp	K 20: GGG KAG GGG CGT TCT SCG AA K 22: SSS WCT ATW TTA CAC CAA CC CC	120 pares de base	Nicodemo et al.,(2013) ⁸¹	100 ng; 2-4 µL	1x Tampão da enzima 0,2 mM de dNTP's(Fermentas,Thermo Fischer, Ontário,Canadá) 1 mM de MgCl ₂ (Fermentas,Thermo Fischer, Ontário,Canadá) 0,375 µM de cada oligonucleotídeo (IDT,Sinapse Biotecnologia, Califórnia, EUA) 1 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas,Thermo Fischer, Ontário,Canadá)	Desnaturação inicial: 95°C; 300 s Desnaturação: 94°C; 60s Anelamento: 58°C; 60 s Extensão: 72°C; 30s Extensão final: 72°C; 300 s	35

Legenda: ng=nanogramas; °C= graus centígrados; s=segundos.

4.6.4.3.2 kDNA PCR com os oligonucleotídeos iniciadores RV1-RV2 (kDNA PCR RV1-RV2)

Para elucidar casos em que o paciente possuía LV confirmada pelos métodos padrão-ouro, e que, no entanto, a amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e kDNA (K20 e K22), anteriormente descritos, ou na análise do polimorfismo por RFLP, não apresentava resultados condizentes com o padrão-ouro, resolvemos investigar essas amostras, tendo como alvo outra região do kDNA, com os oligonucleotídeos iniciadores RV1 e RV2, previamente utilizados nas amostras oriundas de pacientes do Mato Grosso do Sul, cedidas pela UFMS. Em um segundo momento, testamos amostras dos seguintes grupos: Grupo I, Grupo II, Grupo IV, Grupo V, Grupo VI, Grupo VII e Grupo VIII, na tentativa de encontrar um alvo kDNA mais específico do que os oligonucleotídeos iniciadores K20 e K22 e que amplificasse apenas espécimes pertencentes à espécie *L. (L.) infantum*, como sugerido por Gomes et al., (2007) ⁵⁹ e Lima-Júnior et al., (2009). ¹¹⁴ Para a realização dessa reação kDNA PCR foram utilizados os iniciadores RV1 e RV2, e as condições da PCR utilizadas nas amostras do complexo HCFMUSP estão descritas na **Tabela 6.**

Tabela 6 - Condições da kDNA PCR RV1-RV2, em amostras de pacientes do complexo HCFMUSP.

Gene alvo	Iniciadores	Peso molecular do fragmento amplificado	Artigo referência	Concentração e volume da amostra	Concentração dos reagentes (volume final da reação = 25 µL)	Temperaturas (°C) de ciclagem e tempo de ciclagem (s)	Número de ciclos (MJ Research/USA).
kDNA de <i>Leishmania</i> spp	RV1: CTTTTCTGGTCCCG CGGGTAGG RV2: CCACCTGGCCTATT TTACACCA	145 pares de base	Gomes et al.,2007 ⁵⁹	100 ng; 2-5 µL	1x Tampão da enzima 0,2 mM de dNTP's(Fermentas,Thermo Fischer, Ontário,Canadá) 1 mM de MgCl ₂ (Fermentas,Thermo Fischer, Ontário,Canadá) 0,25 µM de cada oligonucleotídeo (IDT,Sinapse Biotecnologia, Califórnia, EUA) 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas,Thermo Fischer, Ontário,Canadá)	Desnaturação inicial: 95°C; 300 s Desnaturação: 95°C; 30 s Anelamento: 60°C; 30 s Extensão: 72°C; 30s Extensão final: 72°C; 300 s	30

Legenda: ng=nanogramas; °C= graus centígrados ; s=segundos.

4.6.5 Corrida eletroforética

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose padrão (Agargen/Espanha) a 2% preparado com tampão TAE [1x]. Foi utilizado o padrão de peso molecular de 100 pares de base (Fermentas/Canadá), e, em seguida, aplicadas as amostras (10 µL de amostra para 3 µL de azul de bromophenol). A eletroforese em cuba horizontal (Digimed/Brasil) ocorreu durante 45 min. a 100V, 10W e 100 mA, na fonte Lightning Volt-OSP -3000 L (ThermoScientific/USA). Os géis foram corados com brometo de etídio (10 µL em 100 mL de TAE) e examinados em um transiluminador de luz ultravioleta (Alpha Innotech/EUA).

4.6.6 Técnica do polimorfismo por RFLP dos produtos da ITS1 PCR e kDNA PCR.

Foram digeridos volumes de 20 µL do produto de amplificação da ITS1 PCR ou “nested” ITS1 PCR ou kDNA PCR por 1U da enzima de restrição *Hae* III em tampão [1x] (Fermentas/ Canadá), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram submetidas à restrição a 37 °C, durante 3 h, com posterior inativação da enzima a 80°C, por 20 min. Na corrida eletroforética foram utilizados os padrões de peso molecular de 50 pares de base e de 100 pares de base (Fermentas/Canadá) em cada reação, e, em seguida, aplicadas as amostras (10 µL de amostra para 3 µL de azul de bromophenol). Os fragmentos de restrição foram submetidos à eletroforese em gel de agarose Metaphor (Lonza/EUA), uma agarose de alta resolução que dispensa a utilização de cubas verticais para a eletroforese. A concentração da agarose foi de 4% e o gel foi submetido à voltagem de 100 volts em tampão TAE[1x], por 1 h 30 min. Após a corrida foram corados com brometo de etídio (10 µL em 100 mL de TAE) por 15 min. e observados em transiluminador de luz ultravioleta (Alpha Innotech/EUA).

4.6.7 Avaliação da sensibilidade dos oligonucleotídeos iniciadores

4.6.7.1 Avaliação da sensibilidade da ITS1 PCR

Foram analisadas 82 amostras sanguíneas e/ou de aspirado de medula óssea procedentes de 73 pacientes ITS1 PCR.

4.6.7.2 Avaliação da sensibilidade dos oligonucleotídeos iniciadores do kDNA: kDNA PCR K20-K22 e kDNA PCR RV1-RV2

Foram analisadas 48 amostras procedentes de 41 pacientes para a kDNA PCR K20-K22 e 82 amostras de 73 pacientes para a kDNA PCR RV1-RV2

4.6.8 Avaliação da especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores ITS 1 e kDNA

Foram analisadas amostras procedentes do Grupo II para os oligonucleotídeos empregados ITS1 PCR e kDNA PCR (kDNA PCR K20-K22 e kDNA PCR RV1-RV2).

4.6.9 Análise de cepas referência de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* em Sistema Automatizado de Eletroforese Capilar

Na tentativa de encontrar método alternativo para a corrida eletroforética em gel de agarose para PCR convencional e PCR RFLP, no que concerne à utilização de cubas eletroforéticas, brometo de etídio, manipulação de amostras, e no caso do presente estudo, a utilização de agarose Metaphor para a ITS1 PCR RFLP, submetemos os produtos da ITS1 PCR e ITS1 PCR RFLP, procedentes de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445) e de *(L.) chagasi* (MHOM/BR/72/strain46), a um sistema de análise de fragmentos, mediante eletroforese capilar conhecido por GelBot (Loccus Biotecnologia/Brasil). Esse sistema está em fase de implantação no Lab. Soroepidemiologia, portanto, ainda

existem alguns ajustes a serem realizados. Juntamente a cada amostra foi injetado um marcador de alinhamento molecular (MA-1), composto de dois fragmentos de dupla fita de DNA, de 20pb e 1000 pb, utilizados para alinhar todas as corridas e permitir a correta detecção do peso molecular. As corridas têm duração média de 5 min, dependendo da quantidade de amostras analisadas. As amostras analisadas estão descritas na **Tabela 7**:

Tabela 7 - Amostras analisadas no sistema de eletroforese capilar Gelbot.

Reação	Material analisado
ITS1 PCR	Cepa de <i>L. (L.) amazonensis</i> (MHOM/BR/1973/M2269) e Cepa referência de <i>L. (L.) chagasi</i> (MHOM/BR/81/M6445)
ITS1 PCR + RFLP	Cepa de <i>L. (L.) amazonensis</i> (MHOM/BR/1973/M2269) e Cepa referência de <i>L. (L.) chagasi</i> (MHOM/BR/81/M6445) + <i>(L.) chagasi</i> (MHOM/BR/72/strain46)

4.6.10 Sequenciamento

Com o objetivo de verificar a presença ou não dos sítios de restrição em amostras nas quais a enzima *Hae* III não agiu, foi realizado sequenciamento da região ITS1 destes exemplares, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores LITSR e L5.8S, a partir do produto de PCR da ITS1 PCR.

Foram sequenciadas 10 amostras pertencentes ao grupo 1, de pacientes com LV, e 2 amostras de cães com LVC confirmada, que não demonstraram sítios de clivagem após a reação de restrição enzimática com a enzima *Hae* III. Duas amostras de pacientes com LV confirmada, que demonstraram os sítios de restrição e a cepa de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445), que utilizamos como referência, também foram sequenciadas.

4.6.10.1 Purificação

Os produtos da PCR que apresentaram especificidade quanto ao tamanho do fragmento esperado, foram purificados com o uso do kit *illustra™ ExoStar™ 1-Step* (GE Healthcare Life Sciences®/EUA). Para cada 5µL do produto de PCR foram adicionados 2µL de *illustra™ ExoStar™ 1-Step* (GE Healthcare Life Sciences®/EUA). A mistura obtida foi levada ao termociclador *BioerLifeTouch®* (Alpha Laboratories/Reino Unido) e submetida às seguintes etapas: 1) 37 °C, por 15 min, para ação enzimática e 2) 80 °C, por 15min, para inativação da enzima.

4.6.10.2 Reação de Sequenciamento e Precipitação

Para o sequenciamento genômico dos produtos purificados foi utilizado o kit *BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing Kit* (Life Technologies™/EUA). Na reação de sequenciamento gênico, os fragmentos de DNA de interesse foram submetidos ao método de determinação de cadeia descrita por Sanger e Coulson (1975).¹¹⁵

As reações foram realizadas com um volume final de 10µL, contendo 3µL do produto de PCR purificado, 1µL de *BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing Kit* (Life Technologies™/EUA), 1µL de LITSR (“forward” ou L5.8S(“reverse”) (10 pm) e 2µL de tampão de sequenciamento (5X) (Life Technologies™/EUA), completando assim o volume final para 10µL com água ultrapura (*Direct-Q UV3®*-Millipore/EUA). Cada reação, uma para o LITSR e outra para o L5.8S, foram submetidos ao seguinte programa de termociclagem: (1) 95 °C por 10 min; (2) 55°C por 15 min; (3) 60°C por 1 min; as etapas 2 e 3 foram repetidas 25 vezes (ciclos); (4) 10°C - ∞. Posteriormente, as amostras foram submetidas a um processo de precipitação antes da leitura das sequências. Para cada amostra contendo 10µL de reação de sequenciamento foram utilizados, à temperatura ambiente, 25µL de etanol 100% (Merck®), 1µL de acetato de sódio a 3M e 1µL de EDTA a 125mM. Após homogeneização, o material foi incubado por 15 min em temperatura ambiente e protegido da luz. As amostras foram então centrifugadas por 45 min, a 1 104 x g (4200 rpm), a 4 °C, com o posterior descarte do sobrenadante. Em seguida, foram

adicionados 35µL de etanol 70%, à temperatura ambiente. Após homogeneização, o material foi centrifugado a $1\ 104 \times g$ (4200 rpm), durante 15min, a 4°C. Essa etapa foi repetida mais uma vez. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram submetidas a 95 °C, por 5 min, em banho seco (Dual ThermoBath®-FINEPCR/Coréia do Sul). As amostras foram introduzidas no Sequenciador ABI Prism 3130XL (16 capilares) (AppliedBiosystems®/EUA).

4.6.10.3 Análise do sequenciamento

A análise do sequenciamento foi feita no programa *Sequencher*®4.1.4 (Genes Code Corporation/EUA). Foi realizada também análise no programa BLAST do que foi obtido no sequenciamento para a cepa de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445), com a sequência referência da região de interesse (KF985171.1). O resultado do sequenciamento das amostras também foi comparado à sequência referência e ao que foi obtido para a cepa de *L. (L.) chagasi* sequenciada.

4.7 Análise estatística

Foi realizada análise dos dados para se determinar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, as probabilidades de resultados falso positivo e falso negativo e eficiência da ITS1 PCR (LITSR e L5.8S) e da kDNA PCR K20-K22, e kDNA PCR RV1-RV2. Pelo índice Kappa foi analisada também a proporção de concordância, além daquela esperada pela aleatoriedade, entre os 3 testes moleculares empregados e o padrão ouro, adotado como referência no presente trabalho (exames parasitológicos realizados em aspirado de medula óssea e em sangue periférico, IrK39 e dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes). O intervalo de confiança foi calculado para 95%, a partir do erro padrão estimado de kappa das amostras e o seu escore Z, correspondente a esse nível de confiança. Um valor de $p \leq 0.05$, foi considerado significativo.

Os dados foram analisados por STATA versão 13.0 (Stata Corp LP, College Station/ Texas/ USA).

5 RESULTADOS

5.1 Análises moleculares

5.1.1 Análise da viabilidade do DNA das amostras, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores da beta-actina humana.

Todas as amostras testadas apresentaram padrão de 520 pares de base, correspondente ao alvo do gene de beta-actina.

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose a 2% das amostras submetidas à PCR para o gene da beta-actina, cujo amplificado é de 520 pares de base (pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb. (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (Colunas de 1 a 13) Amostras de pacientes. (CP) Controle positivo da reação da beta-actina.

5.1.2 Avaliação do limite de detecção dos ensaios moleculares: Sensibilidade analítica.

5.1.2.1 Oligonucleotídeos iniciadores: ITS1 PCR – LITSR e L5.8S (ITS1 PCR) padronizada.

De acordo com a **Figura 4**, mediante a utilização das condições padronizadas para a ITS1 PCR (**Tabela 4**), foi detectado até 0,01 parasito por mL em amostra

sanguínea “batizada” com DNA extraído de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/72/strain46), gerando o fragmento de 320 pares de base (pb). Considerando-se que 1 parasito possui cerca de 100 fg de DNA,¹⁹ o presente ensaio teve a capacidade de detectar até 10^{-2} , ou seja, cerca de 1 fg de DNA de *L. (L.) chagasi* por mL.

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose a 2% para avaliação do limiar de sensibilidade do iniciador ITS1, representado pelo fragmento de 320 pares de base (pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb. (1 a 10^{-2}) Nas colunas, em triplicata, de 1 a 10^{-2} estão representadas as diluições, por mL, das amostras de sangue “batizadas” com promastigotas de cepa *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/72/strain46.) (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (CP) Controle positivo.

5.1.2.2 Oligonucleotídeos iniciadores: kDNA PCR – K20 e K22

De acordo com a **Figura 5**, as condições padronizadas para a kDNA PCR K20-K22 permitiram a detecção de até 1 parasito por mL,¹⁹ em amostra sanguínea “batizada” com DNA extraído de formas promastigotas *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/72/strain46), ou seja, o presente ensaio teve a capacidade de detectar cerca de 100 fg de DNA de *L. (L.) chagasi* por mL, representado pelo fragmento de 120 pares de base.

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose a 2% para avaliação do limiar de sensibilidade do iniciador kDNA (K20 e K22), representado pelo fragmento de 120 pares de base (pb). (LD). (100) Padrão de peso molecular de 50 pb. (10^2 a 1) Nas colunas de 10^2 a 1 estão representadas as diluições, por mL, das amostras de sangue “batizadas” com promastigotas de cepa *L. (L.) chagasi*. (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (CP) Controle positivo de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/72/strain46).

5.1.3 Resultados da PCR em amostras procedentes de diferentes patógenos (Grupo VIII): *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Schistosoma mansoni*, (TG1) *Toxoplasma gondii* cepa ME49, (TG2), *Toxoplasma gondii* cepa RH, (TG3) *Toxoplasma gondii* cepa VEG e *Histoplasma capsulatum*, para análise da especificidade (amplificação inespecífica) dos oligonucleotídeos iniciadores: LITSR e L5.8S (ITS1 PCR), K20-K22 (kDNA PCR K20-K22) e RV1-RV2 (kDNA PCR RV1-RV2)

5.1.3.1 ITS1 PCR

A ITS1 PCR não apresentou amplificação em nenhuma das amostras contendo os patógenos analisados.

5.1.3.2 kDNA PCR K20-K22

Dentre os patógenos analisados, a kDNA PCR K20-K22 apresentou amplificação na altura dos 120 pares de base das amostras de *M. tuberculosis*, *S. mansoni*, *T. gondii* (cepas RH e ME45) e *P. falciparum*.

Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose Padrão a 2% para avaliação da especificidade do iniciador kDNA com os oligonucleotídeos K20 e K22 em amostras de diferentes patógenos. (50) Padrão de peso molecular de 50 pares de base. (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (Colunas de 4-21) Amostras de diferentes patógenos. (MT) *M. tuberculosis*, (PF) *P. falciparum*, (HC) *H. capsulatum*, (SM) *S. mansoni*, (TG1) *T. gondii* cepa ME49, (TG2) *T. gondii* cepa RH, (TG3) *T. gondii* cepa VEG, (TC) *T. cruzi*, (TB) *T. brucei*, (C+) Controle positivo *L.(L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445). (LB) *L.(V.) braziliensis*. (C+) Controle positivo.

5.1.3.3 kDNA PCR RV1-RV2

Dentre os patógenos analisados, a kDNA PCR RV1-RV2 obteve amplificação na altura dos 145 pares de base da amostra de *S. mansoni*. Não houve amplificação com outros patógenos analisados.

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose a 2% para avaliação da especificidade anal da kDNA PCR RV1-RV2 em amostras de diferentes patógenos. (50) Padrão de peso molecular de 50 pares de base. (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (Colunas de 4-9) Amostras de diferentes patógenos, onde: (MT) *M. tuberculosis*, (PF) *P. falciparum*, (TCZ) *T. cruzi*, (TB) *T. brucei*, (SM) *S. mansoni*, (TG1) *T. gondii* cepa ME49, (TG2) *T. gondii* cepa RH, (TG3) *T. gondii* cepa VEG, (HC) *H. capsulatum*. (C+) Controle positivo *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445).

5.1.4 Avaliação das cepas referência de *Leishmania* spp.

5.1.4.1 Técnica de análise do polimorfismo por RFLP, com a enzima de restrição *Hae* III, em cepas referência de *Leishmania* sp submetidas à ITS1 PCR (LITSR e L5.8S) – ITS1 PCR RFLP.

Na **Tabela 8**, seguem os fragmentos gerados por RFLP em produtos da ITS1 PCR nas cepas referência.

Tabela 8 - Polimorfismo dos fragmentos de restrição gerados nas amostras de cepas referências de *Leishmania* sp, após técnica de análise do polimorfismo

por RFLP com *Hae* III, em produtos da ITS1 PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores LITSR e L5.8S, de acordo com a literatura consultada.

Referências	Espécie (s)	Fragmentos, em pares de base, gerados após RFLP, de acordo com a literatura consultada
Instituto Oswaldo Cruz, 2009 ¹⁰¹ Rodrigues, 2012 ¹⁰⁰	<i>L. (L.) chagasi</i> e <i>L. (L.) donovani</i> ,	180, 70 e 50
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	190 e 140
	<i>L. (L.) major</i>	200 e 140
	<i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L. (V.) lainsoni</i> , <i>L. (V.) shawi</i> e <i>L. (V.) guyanensis</i>	160 e 150
	<i>L. (V.) naiffi</i>	155

Na **Figura 8**, são demonstrados os perfis eletroforéticos descritos na **Tabela 8**:

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose Metaphor a 4% utilizando cepas referência de *Leishmania* para avaliação da ITS1 PCR RFLP. (50) Padrão de peso

molecular de 50 pares de base (pb). (LL) *L. (V.) lainsoni* (160 e 150 pb), (LN) *L. (V.) naiffi* (155pb), (LS), *L.(V.) shawi* (160 e 150 pb), (LB) *L.(V.) braziliensis* (160 e 150 pb), (LG) *L.(V.) guyanensis* (160 e 150 pb), (LA) *L.(L.) amazonensis* (190 e 140 pb), (LC1) *L.(L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445) (180, 70 e 50 pb), (LC2) *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/72/strain46)(180, 70 e 50 pb), (LM) *L.(L.) major* (200 e 140 pb) e (LD) *L.(L.) donovani* (180, 70 e 50 pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb.

5.1.4.2 Técnica de análise do polimorfismo por RFLP, com a enzima de restrição *Hae* III, em cepas referência de *Leishmania* sp submetidas à kDNA PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores K20 e K22 (kDNA PCR RFLP).

Na Tabela 9, seguem os fragmentos gerados por RFLP em produtos da kDNA PCR K20-K22 nas cepas referência.

Tabela 9 - Polimorfismo dos fragmentos de restrição gerados nas amostras de cepas referências de *Leishmania* sp, após técnica do polimorfismo por RFLP, mediante a utilização da enzima *Hae* III, em produtos da kDNA PCR K20-K22(kDNA PCR RFLP).

Referência	Espécie	Fragmentos, em pares de base, gerados após RFLP, de acordo com a literatura consultada.
de Andrade et al., 2006 ¹¹⁹	<i>L.(L.) infantum</i> (sin. <i>chagasi</i>),	120,80,60
	<i>L.(L.) donovani</i>	
	<i>L.(L.) amazonensis</i> , <i>L.(V.)</i>	120
	<i>lainsoni</i> , <i>L.(L.) major</i>	
	<i>L.(V.) braziliensis</i> , <i>L.(V.) guyanensi</i>	120,80,40
	<i>L.(V.) shawi</i> , <i>L.(V.) naiffi</i>	

Na **Figura 9**, são demonstrados os perfis eletroforéticos descritos na **Tabela 9**, utilizando cepas referencias de *Leishmania*:

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose Metaphor a 4% utilizando cepas referência de *Leishmania* para avaliação da kDNA PCR RFLP. (50) Padrão de peso molecular de 50 pares de base (pb). (LL) *L. (V.) lainsoni* (120pb), (LN) *L. (V.) naiffi* (120, 80,40 pb), (LS) *L. (V.) shawi* (120,80,40 pb), (LB) *L. (V.) braziliensis* (120,80,40 pb), (LG) *L. (V.) guyanensis* (120,80,40 pb), (LA) *L. (L.) amazonensis* (120 pb), (LC1) *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445) (120,80,60 pb), (LC2) *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/72/strain46) (120,80,60 pb), (LM) *L. (L.) major* (120 pb) e (LD) *L. (L.) donovani* (120,80,60 pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb.

5.1.4.3 Análise da kDNA PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores RV1 e RV2 (kDNA PCR RV1-RV2), utilizando cepas referência de *Leishmania* sp.

A kDNA PCR RV1-RV2 quando realizada em amostras de cepas referência, obteve amplificação do fragmento de 145 pb para as amostras de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*, que são parasitos que pertencem ao subgênero *Leishmania*.

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose a 2% da kDNA PCR RV1-RV2 utilizando cepas referência de *Leishmania*, avaliadas por meio do amplificado de 145 pares de base (pb). (50) Padrão de peso molecular de 50 pb. (LC) *L.(L.) chagasi*, (LB) *L.(V.) braziliensis*, (LG) *L.(V.) guyanensis*, (LN) *L. (V.) naiffi*, (LS), *L.(V.) shawi*, (LA) *L.(L.) amazonensis*.

5.1.5 Análise dos oligonucleotídeos iniciadores em amostras biológicas.

5.1.5.1 Resultados em amostras de pacientes com leishmaniose visceral confirmada - Grupo I.

5.1.5.1.1 ITS1 PCR e ITS1 PCR RFLP.

Das 82 amostras de 73 pacientes com LV confirmada e testadas na ITS1 PCR, 97,5% (80/82) foram positivas na ITS1 PCR. Na **Figura 11** apresentamos os fragmentos de 320 pares gerados pela ITS1 PCR em amostras de pacientes com LV confirmada.

Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose a 2% da ITS1 PCR em amostras de pacientes com LV confirmada, por meio do amplificado de 320 pares de base (pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb. (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (1, 2 e 3). Amostras de pacientes com LV confirmada. (LC) Controle positivo de *L. (L.) chagasi*.

Das 80 amostras positivas, 52,5% (42/80) foram caracterizadas pela RFLP, com padrão similar ao de *L. (L.) infantum*, sinônimo de *L. (L.) chagasi*, e apresentando perfil de 180, 70 e 50 pares de base. Na Figura 12 apresentamos os fragmentos obtidos por RFLP, em duas amostras de pacientes pertencentes ao Grupo I.

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose Metaphor a 4% da ITS1 PCR RFLP, para avaliação de perfis obtidos com as amostras dos pacientes com LV confirmada. (50) Padrão de peso molecular de 50 pares de base (pb). (LA) *L. (L.) amazonensis* (190 e 140 pb), (LC) *L. (L.) chagasi* (180,70,50 pb). (1 e 2). Amostras de pacientes com LV confirmada. (LM) *L. (L.) major* (200,140 pb). (LB) *L. (V.) braziliensis* (160,150 pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb.

5.1.5.1.2 kDNA PCR – oligonucleotídeos iniciadores K20 e K22 e kDNA PCR RFLP.

Neste ensaio foram testadas 48 amostras, de 41 pacientes, dos quais 98% (47/48) foram positivos na kDNA PCR K20-K22. Na **Figura 13** apresentamos os fragmentos de 120 pares, gerados pela kDNA PCR K20-K22 em amostras de pacientes com LV confirmada.

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose a 2% da kDNA PCR K20-K22, de amostras de pacientes com LV confirmada, por meio do amplificado de 120 pares de base (pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb. (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (1 e 2) Amostras de pacientes com LV confirmada. (LC) Controle positivo de *L. (L.) chagasi*.

Das 47 amostras positivas na kDNA PCR K20-K22, 55,3% (26/47) apresentaram perfil similar ao de *L. (L.) chagasi*, sin *L. (L.) infantum*, na RFLP. Em 90% das reações de kDNA PCR RFLP, a banda de 80 pares de base não foi visualizada, tanto para o controle positivo de cepa referência, quanto para as amostras de pacientes, como demonstrado na **Figura 14**.

Figura 14– Eletroforese em gel de agarose Metaphor a 4% da kDNA PCR RFLP, para avaliação de perfis obtidos com as amostras dos pacientes com LV confirmada. (50) Padrão de peso molecular de 50 pares de base (pb). (Colunas de 1 a 4) Amostras de pacientes com LV confirmada. (LC) Controle positivo de *L. (L.) chagasi*. (100) Padrão de peso molecular de 100 pb.

5.1.5.1.3 kDNA PCR – oligonucleotídeos iniciadores RV1 e RV2.

Neste ensaio foram testadas 82 amostras, de 73 pacientes, e dessas, 92,68% (76/82) foram positivas na kDNA PCR RV1-RV2. As 6 amostras negativas são oriundas de um processo de re-extração de DNA, diante do esgotamento do volume das amostras.

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose a 2% para avaliação da sensibilidade da kDNA PCR RV1-RV2 em amostras de indivíduos com LV confirmada, por meio do amplificado de 145 pares de base (pb). (50) Padrão de peso molecular de 50 pb. (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (Colunas de 4 a 10) Amostras de pacientes. (LC) Controle positivo de *L. (L.) chagasi*.

Na **Tabela 10** estão os resultados obtidos nas técnicas padrão-ouro e nos ensaios moleculares das amostras pertencentes ao Grupo 1:

Tabela 10 - Resultados obtidos nas técnicas padrão-ouro para o diagnóstico da leishmaniose visceral e nos testes moleculares ITS1 PCR, kDNA PCR K20-K22 e kDNA PCR RV1-RV2 empregados nas amostras de pacientes com leishmaniose visceral, seguidos da definição do agente etiológico após a realização do RFLP.

Pac	HIV	Clínica	Epidemiologia	Diagnóstico								
				Técnicas padrão-ouro			Métodos moleculares					
				IrK39	Esfregaço	Cultura	kDNA PCR K20-K22	kDNA PCR RV1- RV2	ITS1 PCR	kDNA PCR RFLP (K20 e K22)	ITS1 PCR RFLP	Sequenciamento
				(complexo <i>donovani</i>)	(<i>Leishmania</i> sp)	(<i>Leishmania</i> sp)	(<i>Leishmania</i> sp)	subgênero <i>Leishmania</i>	(<i>Leishmania</i> sp)	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L.(L) infantum</i>	<i>L.(L)infantum</i>
1	N	Febre associada a faringite. Cansaço e tontura.	-Procedente de Balsas/MA -IFI 1:80 fora do HCFMUSP -Possuía cão com LV.	N	N	N	P	P	P	SD	SD	BQ
2	N	HeEs e febre	-Procedente de Morro do Chapéu/BA -Cão morreu com sinais de LV canina	P	P	N	P	P	P	NR	P	NR
3	P	He e febre	-Procedente de MT	N	P	N	P	P	P	P	P	NR
4	P	HeEs e febre	-Procedente de Assis/SP	N	P	N	P	P	P	SD	SD	P
5	SI	Perda de peso e anemia	-Procedente de Crato/Ceará -Histórico de LV	P	N	N	P	P	P	P	SD	P
6	SI	HeEs, febre e perda de peso	-Procedente de Senhor do Bonfim/BA	P	N	N	P	P	P	P	SD	P
7	P	HeEs, febre, perda de peso	-Procedente de MT	N	NR	NR	P	P	P	P	P	NR

Pac	HIV	Clínica	Epidemiologia	Diagnóstico								
				Técnicas padrão-ouro			Métodos moleculares					
				IrK39	Esfregaço	Cultura	kDNA PCR K20-K22	kDNA PCR RV1- RV2	ITS1 PCR	kDNA PCR RFLP (K20 e K22)	ITS1 PCR RFLP	Sequenciamento
				(complexo <i>donovani</i>)	(<i>Leishmania</i> sp)	(<i>Leishmania</i> sp)	(<i>Leishmania</i> sp)	subgênero <i>Leishmania</i>	(<i>Leishmania</i> sp)	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L.(L) infantum</i>	<i>L.(L)infantum</i>
8	N	HeEs, febre e pancitopenia	- Procedente de Aracuai/MG	N	P	P	P	P	P	P	P	NR
9	P	HeEs e febre	-Procedente de MT	N	NR	NR	P	N	P	P	P	NR
10	P	He, febre, pancitopenia e perda de peso	- Procedente de Ipatinga/MG	N	N	N	P	P	P	SD	SD	NR
11	SI	Es, febre, anemia,perda de peso e leucopenia	- Procedente de Serra Talhada/PE	P	P	P	P	P	P	P	P	NR
12	P	HeEs e febre	-Procedente de MT	N	P	N	P	P	P	P	P	NR
13	P	HeEs e febre	- Procedente de MT	N	P	N	P	N	P	P	P	NR
14	P	HeEs e febre	- Procedente de MT	N	P	N	P	N	P	P	P	NR
15	SI	HeEs e febre	Procedente da BA	P	P	P	P	P	P	P	P	NR
16	N	HeEs e febre	-Procedente de Morro do Chapéu/BA	P	P	N	P	P	P	P	P	NR
17	SI	HeEs e febre	-Procedente de Santa Terezinha/BA -Possuía cães com LV.	P	P	P	P	P	P	P	P	NR
18	N	HeEs, febre e pancitopenia	-Procedente de Alagoas.	P	P	P	P	P	P	P	P	NR
19	SI	Febre	-Procedente de SP/SP.	P	N	N	P	P	P	SD	SD	NR

Diagnóstico												
Pac	HIV	Clínica	Epidemiologia	Técnicas padrão-ouro			Métodos moleculares					
				IrK39	Esfregaço	Cultura	kDNA PCR K20-K22	kDNA PCR RV1- RV2	ITS1 PCR	kDNA PCR RFLP (K20 e K22)	ITS1 PCR RFLP	Sequenciamento
				(complexo <i>donovani</i>)	(<i>Leishmania</i> sp)	(<i>Leishmania</i> sp)	(<i>Leishmania</i> sp)	subgênero <i>Leishmania</i>	(<i>Leishmania</i> sp)	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L.(L) infantum</i>	<i>L.(L)infantum</i>
33	N	HeEs e febre	-Viagem recente para o MS.	P	P	N	P	P	P	P	P	NR
34	P	Es e pancitopenia	-Procedente de Pereira Barreto/ SP.	P	P	N	P	P	P	SD	P	BQ
35	SI	HeEs, febre, perda de peso e pancitopenia	-Procedente de Ipujiara/BA -Possui histórico de LV.	P	N	N	P	P	P	SD	SD	NR
36	SI	HeEs e febre	SI	P	N	N	P	P	N	SD	NR	NR
37	P	HeEs e febre	-Procedente de Natal/RN -Possui histórico de LV	N	N	N	P	P	N	SD	NR	NR
38	N	HeEs e febre	-Viagem recente para a região do Mediterrâneo	P	P	N	P	P	P	P	P	NR
39	N	Es e anemia.	-Procedente de Ibitirama/BA.	P	N	N	P	P	P	SD	SD	NR
40	SI	HeEs e febre	-Procedente do Maranhão	P	P	N	P	P	P	NR	P	P
41	SI	HeEs e febre	SI	P	P	N	P	P	P	NR	P	NR
42	P	He	SI	N	P	N	P	P	P	SD	SD	NR
43	SI	HeEs e febre	SI	P	P	N	P	P	P	SD	P	NR
44	SI	HeEs e febre	-Procedente de Oliveira dos Brejinhos/ BA	P	P	NR	P	P	P	NR	P	NR

Diagnóstico												
Pac	HIV	Clínica	Epidemiologia	Técnicas padrão-ouro			Métodos moleculares					
				IrK39	Esfregaço	Cultura	kDNA PCR K20-K22	kDNA PCR RV1- RV2	ITS1 PCR	kDNA PCR RFLP (K20 e K22)	ITS1 PCR RFLP	Sequenciamento
				(complexo <i>donovani</i>)	(<i>Leishmania</i> sp)	(<i>Leishmania</i> sp)	(<i>Leishmania</i> sp)	subgênero <i>Leishmania</i>	(<i>Leishmania</i> sp)	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L.(L) infantum</i>	<i>L.(L)infantum</i>
45	N	HeEs e febre	-Procedente de AL.	P	NR	NR	P	P	P	P	SD	NR
			-Histórico de LV.									
46	SI	HeEs e febre	-Procedente da BA	P	N	N	P	N	P	NR	P	NR
47	SI	HeEs e febre	-Procedente da BA	P	N	N	P	N	P	SD	SD	BQ
48	N	HeEs e febre	-SI	P	N	N	P	P	P	P	P	NR
49	P	HeEs, febre, plaquetopenia , perda de peso.	-Procedente de Rio Verde/MS	P	P	SI	NR	P	P	NR	P	NR
50	P	HeEs, febre, plaquetopenia , perda de peso.	-Procedente de Rio Verde/MS	P	P	SI	NR	P	P	SD	SD	NR
51	P	HeEs, febre, plaquetopenia , perda de peso.	-Procedente de Campo Grande /MS	P	P	SI	NR	P	P	NR	SD	NR
52	P	Fraqueza, perda de peso.	-Procedente de Campo Grande /MS	SI	P	SI	NR	P	P	NR	SD	NR
53	P	Febre e perda de peso	-Procedente de Dourados/MS	N	P	SI	NR	P	P	NR	SD	NR
54	P	HeEs e febre	-Procedente do MS	SI	P	SI	NR	P	P	NR	NR	NR
55	P	He leve, febre e perda de peso	-Procedente de Campo Grande/MS	SI	P	SI	NR	P	P	NR	SD	NR

Pac	HIV	Clínica	Epidemiologia	Diagnóstico								
				Técnicas padrão-ouro			Métodos moleculares					
				IrK39	Esfregaço	Cultura	kDNA PCR K20-K22	kDNA PCR RV1- RV2	ITS1 PCR	kDNA PCR RFLP (K20 e K22)	ITS1 PCR RFLP	Sequenciamento
				(complexo <i>donovani</i>)	(<i>Leishmania</i> sp)	(<i>Leishmania</i> sp)	(<i>Leishmania</i> sp)	subgênero <i>Leishmania</i>	(<i>Leishmania</i> sp)	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L.(L) infantum</i>	<i>L.(L)infantum</i>
56	P	Plaquetopenia e perda de peso	-Procedente de Campo Grande/MS -Paciente teve 4 recidivas.	SI	P	SI	NR	P	P	NR	P	NR
57	P	HeEs e febre	-Procedente de Aquidauana/MS	SI	N	SI	NR	P	P	NR	P	NR
58	P	He, febre e perda de peso	-Procedente de Rio Negro/MS	SI	P	SI	NR	P	P	NR	SD	NR
59	P	HeEs e perda de peso	-Procedente de Campo Grande/MS	SI	P	SI	NR	P	P	NR	P	NR
60	P	HeEs, febre, fraqueza e perda de peso	-Procedente de Campo Grande/MS	N	P	SI	NR	P	P	NR	P	NR
61	P	Perda de peso e fraqueza	-Procedente de Campo Grande/MS	P	N	SI	NR	P	P	NR	SD	NR
62	P	Febre, fraqueza e perda de peso	-Procedente de Águas Claras/MS	SI	P	SI	NR	P	P	NR	P	NR
63	P	HeEs e febre	-Procedente de Corumbá/MS	N	P	SI	NR	P	P	NR	SD	NR
64	P	Febre e fraqueza	-Procedente de Campo Grande/MS	SI	P	SI	NR	P	P	NR	SD	NR
65	P	Febre, fraqueza e perda de peso	-Procedente de Corumbá/MS	SI	P	SI	NR	P	P	NR	SD	NR
66	N	HeEs, febre, fraqueza, perda de peso	-Procedente de Rio Verde/MS	P	SI	SI	NR	P	P	NR	SD	NR

Pac	HIV	Clínica	Epidemiologia	Diagnóstico								
				Técnicas padrão-ouro			Métodos moleculares					
				IrK39	Esfregaço	Cultura	kDNA PCR K20-K22	kDNA PCR RV1- RV2	ITS1 PCR	kDNA PCR RFLP (K20 e K22)	ITS1 PCR RFLP	Sequenciamento
				(complexo <i>donovani</i>)	(<i>Leishmania</i> sp)	(<i>Leishmania</i> sp)	(<i>Leishmania</i> sp)	subgênero <i>Leishmania</i>	(<i>Leishmania</i> sp)	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L.(L) infantum</i>	<i>L.(L)infantum</i>
67	N	Febre e perda de peso	-Procedente de Campo Grande/MS	P	P	SI	NR	P	P	NR	SD	NR
68	N	HeEs, febre, fraqueza, perda de peso, plaquetopenia	-Procedente de Rio Verde/MS	P	P	SI	NR	P	P	NR	P	NR
69	N	HeEs, febre, fraqueza, perda de peso , plaquetopenia	-Procedente de Campo Grande/MS	P	P	SI	NR	P	P	NR	SD	NR
70	N	HeEs, febre, fraqueza, perda de peso, plaquetopenia	-Procedente de Campo Grande/MS	P	P	SI	NR	P	P	NR	SD	NR
71	N	HeEs, febre, fraqueza, perda de peso, plaquetopenia	-Procedente de Coxim /MS	P	P	SI	NR	P	P	NR	SD	NR
72	N	HeEs, febre, fraqueza, perda de peso, plaquetopenia	-Procedente de Campo Grande/MS	P	P	SI	NR	P	P	NR	SD	NR
73	N	HeEs, febre, fraqueza, perda de peso, plaquetopenia	-Procedente de Campo Grande/MS	P	P	SI	NR	P	P	NR	SD	NR

Diagnóstico												
Pac	HIV	Clínica	Epidemiologia	Técnicas padrão-ouro			Métodos moleculares					
				IrK39	Esfregaço	Cultura	kDNA PCR K20-K22	kDNA PCR RV1- RV2	ITS1 PCR	kDNA PCR RFLP (K20 e K22)	ITS1 PCR RFLP	Sequenciamento
				(complexo <i>donovani</i>)	(<i>Leishmania</i> sp)	(<i>Leishmania</i> sp)	(<i>Leishmania</i> sp)	subgênero <i>Leishmania</i>	(<i>Leishmania</i> sp)	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L.(L) infantum</i>	<i>L.(L)infantum</i>
74	N	He, perda de peso e fraqueza	-Procedente de Dois Irmãos do Buriti/MS	P	P	SI	NR	P	P	NR	SD	NR
75	N	He, perda de peso e fraqueza	-Procedente de Rio Verde/MS -Possuía cão com LV	P	P	SI	NR	P	P	SD	SD	NR
76	N	HeEs, febre, fraqueza, perda de peso, plaquetopenia	Procedente de Campo Grande/MS	P	P	SI	NR	P	P	NR	SD	NR
77	N	HeEs, febre, fraqueza, perda de peso, plaquetopenia	Procedente de Campo Grande/MS	P	P	SI	NR	P	P	NR	SD	NR
78	N	HeEs, febre, fraqueza, e perda de peso	Procedente de Campo Grande/MS	P	P	SI	NR	P	P	NR	P	NR
79	N	Febre, fraqueza e perda de peso	Procedente de Campo Grande/MS	SI	P	SI	NR	P	P	NR	P	NR
80	N	Febre, fraqueza e perda de peso	Procedente Nioaque /MS	P	P	SI	NR	P	P	NR	P	NR
81	N	Es, febre, fraqueza e perda de peso	Procedente de Bonito/MS Possuía cão com LV.	P	P	SI	NR	P	P	NR	P	NR

Pac	HIV	Clínica	Epidemiologia	Diagnóstico								
				Técnicas padrão-ouro			Métodos moleculares					
				IrK39	Esfregaço	Cultura	kDNA PCR K20-K22	kDNA PCR RV1- RV2	ITS1 PCR	kDNA PCR RFLP (K20 e K22)	ITS1 PCR RFLP	Sequenciamento
				(complexo <i>donovani</i>)	(<i>Leishmania</i> sp)	(<i>Leishmania</i> sp)	(<i>Leishmania</i> sp)	subgênero <i>Leishmania</i>	(<i>Leishmania</i> sp)	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L.(L) infantum</i>	<i>L.(L)infantum</i>
82	N	HeEs, febre, perda de peso	Procedente de Campo Grande/MS	P	P	SI	NR	P	P	NR	P	NR

Legenda: Pac=paciente;P= resultado positivo; N= resultado negativo;NR=teste não realizado;SI=sem informação;NR/SI=Não realizado ou sem informação. ;SD=Sem definição de espécie, sem clareza nas bandas; BQ=baixa qualidade, que impossibilitou análise; HeEs=hepato e esplenomegalia; F=febre; He=Hepatomegalia;Es=esplenomegalia; LV=leishmaniose visceral; BA=Estado da Bahia;PE=Estado do Pernambuco;MG=Estado de Minas Gerais; MT=Estado do Mato Grosso;PI=Estado do Piauí; AL=Estado do Alagoas; RN=Estado do Rio Grande do Norte; SP= Estado de São Paulo; MS=Estado do Mato Grosso do Sul;HCFMUSP=Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Após análise dos prontuários (**Tabela 10**), dos pacientes em que foi possível fazê-la, reunimos informações relacionadas com a clínica, epidemiologia e coinfecção *Leishmania*/HIV daqueles pertencentes ao grupo com LV confirmada (Grupo I). De acordo com as características clínicas, das 82 amostras de 73 pacientes, 98,6% (72/73) apresentaram febre, 89% (65/73) tiveram hepatomegalia, e desses, 86,1% (56/65) apresentaram hepatomegalia e esplenomegalia; em 4 situações os pacientes apresentaram esplenomegalia, sem hepatomegalia. Dos 73 pacientes, foram obtidas informações acerca de dados epidemiológicos de 87,7% (64/73). Desses, 96,9% (62/64) eram originários de regiões endêmicas e 2 relataram viagens a locais considerados endêmicos, Mato Grosso do Sul e região do Mediterrâneo. A presença de cão com LVC na residência foi relatada por 2 pacientes.

Dos 73 pacientes do Grupo I, 34,2% (25/73) possuíam a coinfecção de *Leishmania*/HIV; 35,6% (27/73) não eram coinfectados por *Leishmania*/HIV; e de 30,1% (22/73) pacientes não obtivemos informações acerca da presença de coinfecção por *Leishmania*/HIV mediante análise dos prontuários (**Tabela 10**).

No que concerne à análise dos resultados obtidos com as técnicas padrão-ouro, das 82 amostras de 73 pacientes, 80 foram analisadas pelas técnicas parasitológicas de esfregaço e/ou cultura. Destas, obteve-se uma sensibilidade de 76,2% (61/80), ao examinar-se o esfregaço de aspirado de medula óssea e/ou de creme leucocitário de sangue periférico corado com Panótico. A análise do esfregaço foi negativa em 25% (20/80) das amostras de aspirado de medula e/ou de creme leucocitário do sangue periférico. Das 82 amostras, de 73 pacientes, a cultura foi realizada em 44 amostras de aspirado de medula óssea ou creme leucocitário de sangue periférico, obtendo-se uma positividade de 27,2% (12/44). Das amostras nas quais foi empregado o teste Irk39, houve positividade em 76,4% (55/70), e dessas, 27,7% (15/55) pertenciam a pacientes coinfectados por *Leishmania*/HIV. Dos pacientes negativos no ensaio Irk39, 40% (10/25) eram coinfectados por *Leishmania*/HIV. Cinco pacientes (6 amostras), com resultados negativos ou dos quais não se tem informação a respeito da realização dos ensaios

parasitológicos e do Irk39, foram definidos com LV, mediante análise de prontuário, de critérios clínicos e epidemiológicos.

Das 82 amostras testadas, 97,5% (80/82) foram positivas na ITS1 PCR, e dessas, 52,5% (42/80) demonstraram perfil semelhante ao de *L. (L.) infantum* na ITS1 PCR RFLP. Três das amostras que não demonstraram perfil na RFLP da ITS1 PCR e da kDNA PCR K20-K22, obtiveram mais de 90% de identidade com a cepa de *L. (L.) chagasi*, mediante análise das amostras na técnica do sequenciamento, cujos resultados serão descritos posteriormente. Das 48 amostras testadas, 98% (47/48) foram positivas na kDNA PCR K20-K22, e, dessas, 55,3% (26/47) demonstraram perfil na kDNA PCR RFLP semelhante ao obtido com as cepas de *L. (L.) chagasi*. Na kDNA PCR RV1-RV2, das 82 amostras testadas, 92,7% (76/82) foram positivas, definindo o subgênero *Leishmania*.

5.1.5.2 Análise dos oligonucleotídeos iniciadores em amostras de indivíduos saudáveis - Grupo II

5.1.5.2.1 ITS1 PCR e kDNA PCR (K20 e K22 e RV1 e RV2)

Todos os ensaios moleculares, ITS1 PCR, kDNA PCR K20-K22 e kDNA PCR RV1-RV2, foram negativos nas 30 amostras pertencentes a este grupo.

5.1.5.3 Sensibilidade e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores: ITS1 PCR e kDNA PCR (K20 e K22 e RV1 e RV2)

Conforme **Tabela 11**, obteve-se uma especificidade de 100% com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1, K20 e K22 e RV1 e RV2, e sensibilidade de 97,5%, 98% e 92,7%, respectivamente, ao analisar-se as amostras com positividade confirmada para LV (Grupo I) e amostras de indivíduos saudáveis (Grupo II), tendo como referência os testes padrão-ouro adotados no presente estudo (positividade da clínica, da epidemiologia, dos testes parasitológicos e/ou teste imunocromatográfico).

Tabela 11 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, probabilidade de resultado falso positivo, probabilidade de resultado falso negativo e eficiência da ITS1 PCR (LITSR e L5. 8S) e da kDNA PCR K20-K22, e kDNA PCR RV1-RV2, nas amostras com positividade confirmada para LV (Grupo I) e amostras de indivíduos saudáveis (Grupo II), tendo como referência a positividade da clínica, da epidemiologia, dos testes parasitológicos e/ou teste imunocromatográfico.

Testes moleculares	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo positivo	Valor preditivo negativo	Probabilidade de resultado falso positivo	Probabilidade de resultado falso negativo	Eficiência
ITS1 PCR	97,5% (80/82)	100% (0/30)	100%	93,4%	∞	0,025	98,2%
kDNA PCR K20-K22*	98% (47/48)	100% (0/30)	100%	96,7%	∞	0,02	98,7%
kDNA PCR RV1-RV2	92,6% (76/82)	100% (0/30)	100%	83,3%	∞	0,0732	94,6%

Legenda: LV=leishmaniose visceral

*Neste ensaio não foram testadas as amostras procedentes do Mato Grosso Sul.

Quando comparados os resultados obtidos nos testes moleculares ITS1 PCR (LITSR e L5. 8S), kDNA PCR K20-K22 e kDNA PCR RV1-RV2 ao “gold standard”, observa-se uma concordância quase perfeita, com um índice kappa maior que 0,80, e um valor de $p < 0,001$, conforme **Tabela 12**.

Tabela 12 - Análise comparativa dos resultados da ITS1 PCR (LITSR e L5. 8S), da kDNA PCR K20-K22 e da kDNA PCR RV1-RV2 nas amostras com positividade confirmada para leishmaniose visceral (Grupo I) e amostras de indivíduos saudáveis (Grupo II), tendo como referência a positividade da clínica, da epidemiologia, dos testes parasitológicos e/ou teste imunocromatográfico (padrão-ouro).

TESTE	Padrão ouro			Índice kappa (IC 95%)	p
	Positivo	Negativo	total		
kDNA PCR K20-K22				0,973	<0,001
Positivo	47	0	47	(0,752-1,000)	
Negativo	1	30	31		
total	48	30	78		
kDNA PCR RV1-RV2				0,871	<0,001
Positivo	76	0	76	(0,687-1,000)	
Negativo	6	30	36		
total	82	30	112		
ITS1				0,955	<0,001
Positivo	80	0	80	(0,771-1,000)	
Negativo	2	30	32		
total	82	30	112		

Legenda: IC=Intervalo de confiança.

Seguem as tabelas **13**, **14** e **15**, que comparam os oligonucleotídeos iniciadores analisados ITS1 PCR com kDNA PCR K20-K22, ITS1 PCR com

kDNA PCR RV1/RV2 e kDNA PCR K20-K22 com kDNA PCR RV1/RV2, respectivamente.

Tabela 13 - Tabela comparativa dos resultados obtidos na ITS1 PCR e kDNA PCR K20-K22 nas amostras de pacientes com leishmaniose visceral confirmada (Grupo I)

Teste		ITS1 PCR			Indice kappa (IC 95%)
		Positivo	Negativo	Total	
kDNA PCR K20-K22	Positivo	45	2	47	0,92
	Negativo	1	30	31	
	Total	46	32	78	

Legenda: IC=Intervalo de confiança.

De acordo com a **Tabela 13**, de um total de 48 amostras de pacientes com LV confirmada, houve concordância entre a ITS1 PCR e kDNA PCR K20-K22 em 93,7% (45/48) das amostras. Em 3 amostras houve discordância entre a kDNA PCR K20-K22 e a ITS1 PCR, sendo que 2 amostras negativas na ITS1 PCR foram positivas na kDNA PCR K20-K22, e 1 positiva na ITS1 PCR foi negativa na kDNA PCR K20-K22. As 30 amostras procedentes de pacientes negativos apresentaram concordância de 100%, quando comparados os dois pares de iniciadores.

Tabela 14 - Tabela comparativa dos resultados obtidos na ITS1 PCR e kDNA PCR RV1-RV2 nas amostras de pacientes com leishmaniose visceral confirmada (Grupo I)

Teste		ITS1 PCR			Índice kappa (IC 95%)
		Positivo	Negativo	Total	
kDNA PCR RV1-RV2	Positivo	74	2	76	0,831
	Negativo	6	30	36	
	Total	80	32	112	

Legenda: IC=Intervalo de confiança.

De acordo com a **Tabela 14**, de um total de 82 amostras de pacientes com LV confirmada, observa-se que houve concordância entre a ITS1 PCR e o kDNA PCR RV1-RV2 em 90,2% (74/82) das amostras. Houve discordância em 9,75% (8/82), e dessas, 2 foram negativas na ITS1 PCR e positivas na kDNA PCR RV1-RV2, e em 6 amostras, a ITS1 PCR foi positiva e a kDNA PCR RV1-RV2 negativa. As 30 amostras procedentes de pacientes negativos apresentaram concordância de 100% quando comparados os dois pares de iniciadores.

Tabela 15 - Tabela comparativa dos resultados obtidos na kDNA PCR RV1-RV2 e na kDNA PCR K20-K22

		kDNA PCR RV1-RV2			Índice kappa (IC 95%)
		Positivo	Negativo	Total	
kDNA PCR K20-K22	Positivo	41	6	47	0,818
	Negativo	1	30	31	
	Total	42	36	78	

Legenda: IC=Intervalo de confiança.

Considerando as amostras testadas na kDNA PCR RV1-RV2 e na kDNA PCR K20-K22, conforme **Tabela 15**, das 48 amostras de pacientes

verdadeiramente positivos, houve concordância na positividade em 85,4 % (41/48) das amostras. Em 14,5% (7/48) das amostras houve discordância dos resultados obtidos, 6 amostras negativas na kDNA PCR RV1-RV2 foram positivas na kDNA PCR K20-K22, e 1 amostra negativa na kDNA PCR K20-K22 foi positiva na kDNA PCR RV1-RV2. As 30 amostras procedentes de pacientes negativos apresentaram concordância de 100% quando comparados os dois pares de iniciadores.

5.1.5.4 Resultados em 47 amostras de 47 pacientes com suspeita de LV, sem a doença, com exame clínico e/ou epidemiológico positivo - Grupo III.

Dos 47 pacientes do Grupo III, 6 eram procedentes de área endêmica para LV. Onze pacientes apresentaram esplenomegalia e/ou hepatomegalia, e, além desses, 8 pacientes apresentaram febre e/ou pancitopenia associada a perda ponderal. Todas as amostras foram negativas na kDNA PCR K20-K22 e na ITS1-PCR. Essas amostras não foram testadas na kDNA PCR RV1-RV2.

5.1.5.5 Análise dos oligonucleotídeos iniciadores em 16 amostras de 12 pacientes com LV e em tratamento – Grupo IV

Das 16 amostras de 12 pacientes pertencentes ao Grupo IV, 9 foram obtidas de pacientes que em outros momentos do estudo foram diagnosticados com LV ativa, portanto, pertenceram ao Grupo I. Nove dos 12 pacientes eram procedentes de área endêmica para LV, e 1 já havia viajado para área endêmica de LV (Mato Grosso do Sul).

Todas as amostras foram negativas nos testes parasitológicos em aspirado de medula óssea, e/ou creme leucocitário de sangue periférico. No teste imunocromatográfico IrK39, 75% (9/12) dos pacientes foram positivos. Dos 3 pacientes negativos, um era coinfetado com *Leishmania*/HIV, e dos outros dois, não foi possível obter informações acerca de coinfecção por HIV ou obter dados epidemiológicos.

Das 16 amostras analisadas, 37,5% (6/16) obtiveram resultado positivo em um dos testes moleculares empregados. Na ITS1 PCR, 12,5% (2/16) foram positivas e 87,5% (14/16) negativas. A ITS1 PCR RFLP das positivas não gerou perfil, permanecendo com o tamanho de 320 pb. Das 16 amostras, 100% (16/16) foram negativas na kDNA PCR K20-K22. Na kDNA PCR RV1-RV2, 25% (4/16) foram positivas e 75% (12/16) negativas.

5.1.5.6 Análise dos oligonucleotídeos iniciadores em 14 amostras biológicas de 14 cães com leishmaniose visceral confirmada por exame clínico e parasitológico – Grupo V

Todas as amostras pertencentes ao Grupo V eram de cães procedentes de região endêmica do Estado do Piauí, e 100% (14/14) foram positivas na análise do esfregaço em lâmina e no IrK39. Foram positivas na ITS1 PCR 86% (12/14) e, dessas, 83,3% (10/12) demonstraram o perfil similar ao de *L. (L.) infantum* (**Figura 16**).

Foram positivas 28,57% (4/14) das amostras na kDNA PCR K20-K22 e as 4 amostras não apresentaram o perfil eletroforético na kDNA RFLP.

Na kDNA PCR RV1-RV2, 86% (12/14) das amostras foram positivas. A corrida eletroforética com as amostras positivas está demonstrada na **Figura 17**:

Figura 16- Eletroforese em gel de agarose Metaphor a 4% para avaliação da ITS1 PCR RFLP em amostras de cães com LV confirmada. (50) Padrão de peso molecular de 50 pares de base (pb). (Colunas de 1 a 4) Amostras de cães com LV confirmada. (LC) Controle positivo de *L. (L.) chagasi* (180,70,50 pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb.

Figura 17- Eletroforese em gel de agarose a 2% para avaliação da positividade da kDNA PCR RV1-RV2, em amostras de cães com LVC confirmada, por meio do amplificado de 145 pares de base (pb). (50) Padrão de peso molecular de 50 pb. (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (Colunas de 1 a 6) Amostras de cães com LVC confirmada. (LC) Controle positivo de *L. (L.) chagasi*.

De acordo com a **Tabela 16**, os testes moleculares diagnosticaram 86% de amostras caninas (12/14) e foi possível definir a espécie por meio da ITS1-PCR RFLP em 84% (10/12) das amostras. Segue **Tabela 16** com descrição dos resultados encontrados para amostras pertencentes ao Grupo V:

Tabela 16 - Resultados obtidos em técnica padrão-ouro para o diagnóstico da leishmaniose visceral e nos testes moleculares (ITS1 PCR, kDNA PCR K20-K22 e kDNA PCR RV1-RV2,) com as amostras de cães com leishmaniose visceral (Grupo V), seguidos da definição do agente etiológico por RFLP.

		<u>Diagnóstico</u>							
		Técnicas padrão-ouro		Métodos moleculares					
Cão	Epidemiologia	IrK39	Esfregaço de aspirado de medula	kDNA PCR K20-K22	kDNA PCR RV1 - RV2	ITS1 PCR	kDNA PCR RFLP (K20 e K22)	ITS1 PCR RFLP	Sequenciamento
		(complexo <i>donovani</i>)	(<i>Leishmania</i> sp)	(<i>Leishmania</i> sp)	(subgênero <i>Leishmania</i>)	(<i>Leishmania</i> sp)	<i>L(L.)infantum</i>	<i>L(L.)infantum</i>	(<i>L(L.)infantum</i>)
1	• Procedente do PI.	P	P	N	P	P	NR	P	NR
2	• Procedente do PI.	P	P	N	N	N	NR	NR	NR
3	• Procedente do PI.	P	P	N	P	P	NR	P	NR
4	• Procedente do PI.	P	P	N	P	P	NR	SD	BQ
5	• Procedente do PI.	P	P	P	P	P	SD	P	NR
6	• Procedente do PI.	P	P	N	P	P	NR	P	NR
7	• Procedente do PI.	P	P	N	P	P	NR	P	NR
8	• Procedente do PI.	P	P	N	P	P	NR	P	NR
9	• Procedente do PI.	P	P	N	N	P	NR	SD	P
10	• Procedente do PI.	P	P	P	P	P	SD	P	NR
11	• Procedente do PI.	P	P	P	P	P	SD	P	NR
12	• Procedente do PI.	P	P	NR	N	N	NR	NR	NR
13	• Procedente do PI.	P	P	N	N	P	NR	P	NR
14	• Procedente do PI.	P	P	P	N	P	SD	P	NR

Legenda: IrK39= teste imunocromatográfico ;P= resultado positivo; N= resultado negativo; SD =Sem definição de espécie, sem clareza nas bandas; BQ=baixa qualidade, que impossibilitou análise.PI=Estado do Piauí

5.1.5.7 Análise dos oligonucleotídeos iniciadores em amostra de “pool” de flebotomíneos infectados com sangue de cão com leishmaniose visceral – Grupo VI.

Os oligonucleotídeos iniciadores da ITS1 PCR e da kDNA PCR (K20 e K22; RV1 e RV2) obtiveram amplificação de seu fragmento correspondente, em amostra de “pool” de flebotomíneos infectados com sangue de cão com LVC. Na ITS1 PCR RFLP e na kDNA PCR RFLP, com os iniciadores K20 e K22, as amostras apresentaram perfil semelhante ao de *L. (L.) infantum*. A corrida eletroforética demonstrando a amplificação obtida para essa amostra na ITS1 PCR RFLP está representada na **Figura 18**, na kDNA PCR RFLP está representada na **Figura 19**, e na **Figura 20**, kDNA RV1-RV2:

Figura 18- Eletroforese em gel de agarose Methaphor a 4% para avaliação da ITS1 PCR RFLP, em amostra de “pool” de flebotomíneos infectados com sangue de cão com LVC. (100) Padrão de peso molecular de 100 pares de base (pb). (Colunas de 1 a 2) Amostra de “pool” de flebotomíneo. (LC) Controle positivo de *L. (L.) chagasi*.

Figura 19- Eletroforese em gel de agarose Methaphor a 4% para avaliação da kDNA PCR RFLP em amostra de “pool” de flebotomíneos infectados com sangue de cão com LVC. (100) Padrão de peso molecular de 100 pares de base (pb). (Colunas de 1 a 4) Amostra de flebotomíneo. (CP) Controle positivo de *L. (L.) chagasi*.

Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose a 2% para avaliação da kDNA PCR RV1-RV2 em amostra de “pool” de flebotomíneos infectados com sangue de cão com LVC, por meio da amplificação de fragmento de 145 pares de base (pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb. (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (1) Amostra de flebotomíneo. (CP) Controle positivo de *L. (L.) chagasi*.

5.1.5.8 Análise dos oligonucleotídeos iniciadores em 18 amostras de 18 pacientes com leishmaniose tegumentar (LT) – Grupo VII

5.1.5.8.1 ITS1 PCR e ITS1 PCR RFLP

Na ITS1 PCR, 72% (13/18) das amostras foram positivas, e dessas, 69% (9/13) demonstraram o perfil similar ao apresentado por *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) lainsoni*, *L.(V.) shawi* e *L.(V.) guyanensis*.

Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose Metaphor 4% da ITS1 PCR RFLP, de amostras sanguíneas dos pacientes com LT confirmada. (50) Padrão de peso molecular de 50 pares de base (pb). (LC1) *L. (L.) chagasi* (180, 70 e 50 pb). (LA) *L. (L.) amazonensis* (190 e 140 pb). (LT1, LT2 e LT3). Amostras de pacientes com LT confirmada. (LB) *L. (V.) braziliensis* (160 e 150 pb). (100) Padrão de peso molecular de 100 pb.

5.1.5.8.2 kDNA PCR – kDNA PCR K20-K22.

Na kDNA PCR K20-K22, 100% (18/18) das amostras foram positivas, sendo que, 5,5% (1/18) demonstraram o perfil similar ao apresentado por *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) guyanensis*, e 61% (11/18) não possuíam produto suficiente para ser analisado na kDNA PCR RFLP.

5.1.5.8.3 kDNA PCR – kDNA PCR RV1-RV2.

Na kDNA PCR RV1-RV2, 11% (2/18) das amostras foram positivas. Uma dessas amostras não apresentou perfil de RFLP na ITS1 PCR RFLP e na kDNA PCR RFLP, e a outra apresentou o perfil similar a *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) guyanensis* na ITS1 PCR RFLP, e não apresentou perfil na kDNA PCR RFLP.

Figura 22- Eletroforese em gel de agarose a 2% para avaliação da kDNA PCR RV1-RV2 em amostras de pacientes com LT. (100) Padrão de peso molecular de 100 pares de base (pb). (CR) Controle da sala de reagentes. (CE) Controle da sala de extração. (1 e 2) Amostras de pacientes com LT. (CP) Controle positivo de *L. (L.) chagasi*. .

5.2 Análise de cepas referência de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* após ITS1 PCR, em Sistema Automatizado de Eletroforese Capilar-GelBot (Loccus Biotecnologia/Brasil)

Em análise por sistema automatizado de eletroforese capilar por meio do aparelho Gelbot (Loccus Biotecnologia/Brasil) foram obtidos os seguintes resultados:

5.2.1 ITS1 PCR

Amostra pertencente à cepa de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) testada na ITS1 PCR, obteve o padrão de 318 pares de base. Para *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445) o padrão obtido foi de 326 pares de base.

5.2.2 ITS1 PCR RFLP

A RFLP dos produtos da ITS1 PCR de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445) e *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/72/strain46) obteve os padrões de 186 e 40 pares de base e 182, 73 e 53 pares de base, respectivamente.

Gráfico 1- Gráfico gerado pelo aparelho GelBot (Loccus Biotecnologia/Brasil) após análise das amostras submetidas à ITS1 PCR e ITS1 PCR RFLP. Em vermelho, encontra-se o padrão molecular utilizado pelo aparelho, contendo

indicação dos 20 pb e 1000 pb indicados por setas, com suas respectivas bandas presentes em cada amostra. Em azul, há demonstração do pico de 318 pares de base correspondente à *L. (L.) amazonensis*; em verde, 326 pares de base correspondente à *L. (L.) chagasi*; em preto, picos que representam os padrões de 182,73 e 53 pares de base obtidos na ITS1PCR RFLP para *L. (L.) chagasi*, e, em roxo, picos que representam os padrões de 186 e 140 pares de base obtidos na ITS1 PCR RFLP para *L. (L.) amazonensis*.

5.3 Sequenciamento

A sequência referência (KF985171.1) empregada no presente estudo obteve, mediante análise no software BLAST (NCBI), 98% de identidade com *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445). Tais sequências apresentaram diferenças em 5 nucleotídeos, conforme é demonstrado na **Figura 23**:

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
525 bits(284)	5e-154()	297/302(98%)	5/302(1%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 2	CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCGGCAAAAAACATATACAAC	CGGGGGAGACCTAT	61		
Sbjct 1	CTGGATCATTTTCCGATGATTACACC--CAAAAAACATATACAAC	TC--GGGGAGACCTAT	57		
Query 62	GTATATATATGTAGGCCTTTCCCACATACACAGCAAAGTTTTGTACTCAAAA	TTCGAGT	121		
Sbjct 58	GTATATATATGTAGGCCTTTCCCACATACACAGCAAAGTTTTGTACTCAAAA	TTCGAGT	117		
Query 122	aaaaaaaaGGCCGATCGACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAAATG	CCGTTT	181		
Sbjct 118	AAAAAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAAATG	CCGTTT	177		
Query 182	ATACAAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTGCGTGTGTGGTA	AACGGC	241		
Sbjct 178	ATACAAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTGCGTGTGTGGTA	AACG-C	236		
Query 242	TCACATTAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTCGTTGAAGAACGCAGT	AAA	301		
Sbjct 237	TCACA-TAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTCGTTGAAGAACGCAGT	AAA	295		
Query 302	GT	303			
Sbjct 296	GT	297			

Figura 23- Alinhamento das sequências de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445) e da sequência referência KF985171.1 de *Leishmania*.

Das 14 amostras sequenciadas foi possível analisar o resultado de 9 no programa *Sequencher*®4.1.4 (Genes Code Corporation), e 100% (9/9) apresentaram similaridade

com a sequência referência (KF985171.1), sendo que 8 delas pertenciam ao Grupo 1 e correspondem às amostras de número 4, 5, 6, 20, 23, 24, 26 e 40 da **Tabela 10**. A nona amostra (número 9 da **Tabela 16**) pertence ao Grupo V, de cães com LVC confirmada.

Embora algumas dessas amostras não tenham mostrado perfil na ITS1 PCR RFLP, em nenhuma delas foi observada deleção das regiões (sítios GGCC), onde a enzima *Hae* III realiza clivagem. Tais regiões foram destacadas, em cinza escuro, e indicadas pelas setas, na **Figura 24** que representa 7 das 9 amostras analisadas:

Figura 24- Figura do alinhamento das amostras com destaque mediante utilização de seta e coloração marrom para os dois sítios de restrição encontrados na amostra, que, por conseguinte geram os 3 fragmentos nas amostras de pacientes com LV (Grupo I) e de cães com LV (Grupo V).

6 DISCUSSÃO

O diagnóstico rápido e preciso do agente etiológico da LV é extremamente importante, tendo em vista a necessidade de tratamento imediato dessa moléstia. Considerável número de óbitos é observado, especialmente em crianças desnutridas e indivíduos com imunodeficiências, quando não tratados. Para um adequado tratamento, também é recomendada a identificação da espécie, principalmente nos casos de coinfeção de *Leishmania*/vírus da imunodeficiência humana (HIV), quando os pacientes podem apresentar quadros severos de imunodepressão associados à sintomatologia diversa relacionada com a LV.^{10,82} Há descrição na literatura de casos atípicos em pacientes imunocompetentes, com a *L. (L.) infantum* ocasionando LT.¹¹ Além disso, há necessidade de se complementar as técnicas diagnósticas utilizadas para a vigilância epidemiológica, a fim de se detectar e definir casos de LV humana, estabelecendo-se, assim, medidas eficazes e seguras de controle da LV.^{21,72}

Sob o ponto de vista clínico e epidemiológico, ressalta-se também a importância da definição do agente causador de tal moléstia, diante do encontro de outros tripanossomatídeos que não leishmânias, no vetor das leishmanioses, os flebotomíneos,⁸³ bem como de haver na literatura descrição de manifestações cutâneas relacionadas com a lesão dérmica pós-calazar (PKDL) envolvendo *L. (L.) infantum*.²⁶ Portanto, casos de leishmaniose tegumentar (LT) causada por essa espécie fora do Velho Mundo, inclusive no Brasil,^{11,82} já foram descritos, como também, caso de LV causada por espécie dermatrópica.⁵ Assim como manifestações incomuns de leishmaniose causada por *L. (L.) infantum*, também foram descritos casos de coinfeção de espécies causadoras de LT e LV.^{52,62} Ainda em termos relacionados à epidemiologia, a definição das espécies envolvidas nas leishmanioses caninas deve ser preconizada, uma vez que há extensa lista de manifestações que os cães podem apresentar, e é sabido que casos de LV canina precedem os humanos.³⁹

Os aspectos clínicos e epidemiológicos do paciente podem, por si só, definir um caso da doença.²³ No entanto, diante das diferentes modalidades de LV, os pacientes podem apresentar sintomatologias diferentes do que é usualmente observado em suspeitos da infecção. Tal afirmação pode ser exemplificada por meio de relatos de caso

apresentados por Lyra et al. (2015),⁸² no qual paciente HIV positivo foi diagnosticado com LT causada por *L. (L.) infantum*; no trabalho de Castro et al., (2016),¹¹ no qual pacientes imunocompetentes foram diagnosticados com LT causada por *L. (L.) infantum*, ou por relato de Silva et al., (2002),⁵ no qual paciente HIV positivo apresentou LV causada por *L. (V.) braziliensis*.

Em relação ao presente estudo, no que concerne à clínica, das 82 amostras de 73 pacientes pertencentes ao Grupo 1, em 98,6% (72/73) dos registros os pacientes apresentaram febre, 89% (65/73) tiveram hepatomegalia, e 86,1% (56/73) apresentaram hepatomegalia e esplenomegalia. Em 4 ocasiões os pacientes apresentaram esplenomegalia, sem a presença de hepatomegalia. Tais manifestações tem relação com a clínica comumente apresentada por indivíduos acometidos por essa infecção, que são febre, acompanhada de aumento no volume abdominal, perda de peso, anorexia e pancitopenia.^{3, 13, 56} Recentemente, relatamos caso de paciente coinfetado por *Leishmania*/HIV, que além de pancitopenia e esplenomegalia, apresentava lesões nas pregas vocais, sendo este último sintoma, compatível com LT (artigo em fase de submissão).

Acerca dos dados epidemiológicos, dos 73 pacientes foram obtidos dados referentes à procedência de 87,7% (64/73). Das 64 localidades das quais os pacientes eram procedentes ou apresentavam relato de viagem, a grande maioria possuía constante registro pelo SINAN, como municípios/estados em que ocorre a infecção por LV nos últimos 3 anos.³⁶ Dois desses 73 pacientes relataram a presença de cão com LVC em suas residências.

Dos 73 pacientes do Grupo 1, 34,2% (25/73) possuíam a coinfeção de *Leishmania*/HIV; 35,6% (27/73) dos pacientes não eram coinfetados por *Leishmania*/HIV, e não obtivemos informações acerca da presença de coinfeção por *Leishmania*/HIV em 30,1% (22/73) dos pacientes. É de extrema relevância levantar tais dados, uma vez que é preconizado pelo Ministério da Saúde (2015)¹⁰ a identificação das espécies causadoras de LV nos pacientes coinfetados com *Leishmania* e HIV, devido ao amplo espectro de manifestações clínicas apresentadas, ocasionadas pela imunossupressão dos dois agentes infecciosos, um parasito e um vírus.^{24, 25, 26,65,82} Um paciente do presente estudo (paciente 34 da **Tabela 10**) com a coinfeção

Leishmania/HIV apresentou sintomatologia similar à leishmaniose mucosa, com lesões nas pregas vocais (artigo em fase de submissão). Há também na literatura descrição de manifestações atípicas ligadas à *L. (L.) infantum* em pacientes imunocompetentes.¹¹ Portanto, embora de suma importância, o diagnóstico clínico da LV na grande maioria dos casos não é suficiente para definir a doença. Diante disso, ele deverá estar associado a um diagnóstico laboratorial bem elaborado, altamente sensível e específico, que confira confiabilidade para a realização de tratamento específico e imediato.¹ De acordo com o Ministério da Saúde (2011),¹⁶ um caso de LV é confirmado quando apresenta suspeita clínica e possui diagnóstico laboratorial positivo nos testes parasitológicos (esfregaço ou cultura), ou imunofluorescência indireta com títulos iguais ou acima de 80, ou quando a amostra apresenta positividade nos testes imunocromatográficos que utilizam antígenos recombinantes. Ainda existe um critério clínico-epidemiológico, no qual é avaliada a resposta do paciente ao tratamento para LV. Nesse caso, paciente com suspeita de LV procedente de área endêmica e diagnóstico laboratorial negativo, porém, com resposta satisfatória ao teste terapêutico também é considerado critério de confirmação de caso de LV.

Os exames parasitológicos, esfregaço e cultura de aspirado de medula óssea são considerados padrão-ouro para o diagnóstico da LV, mesmo possuindo sensibilidade variável, porém possuem alta especificidade na detecção de *Leishmania* sp, em amostras de obtenção invasiva, tais como aspirado de baço, de medula e de linfonodos.²³ Em amostra de sangue, é sabido que há baixa sensibilidade de ambos os métodos, mesmo em indivíduos que apresentem alta parasitemia, como no caso dos coinfectados por *Leishmania*/HIV.⁷¹ Dessas técnicas, a cultura pode apresentar ainda mais variabilidade em sua sensibilidade, de acordo com o meio empregado, modo de processamento, etc.⁶⁴ Portanto, embora demonstrem a presença do parasito na amostra, não constituem exemplos de técnicas capazes de definir o agente etiológico da LV, uma vez que não é possível realizar distinção do parasito em análise microscópica em ambas as técnicas, sendo possível afirmar apenas a detecção de *Leishmania* sp.^{72, 103}

Das 82 amostras do Grupo 1, 80 foram analisadas mediante o emprego das técnicas parasitológicas (esfregaço e/ou cultura). Dessas, 76,2% (61/80) foram positivas no esfregaço de aspirado de medula óssea e/ou creme leucocitário de sangue periférico

corado com Panótico. Diferentemente de nossos achados, Salam et al., (2012)¹¹⁶ encontraram alta sensibilidade (92%) em esfregaço confeccionado a partir de amostra de creme leucocitário, procedente de amostras de pacientes com LV, confirmada pela clínica e teste rápido, empregando a proteína recombinante rk39. No entanto, a espécie causadora de LV era a *Leishmania (Leishmania) donovani*, que pode ser encontrada com maior facilidade na corrente sanguínea. Kaouech et al., (2007)⁷⁰, encontraram 79% de sensibilidade (42/53) do esfregaço de aspirado de medula óssea corado com Giemsa, procedente de amostras de crianças HIV negativas com suspeita clínica de LV. Em nosso estudo, a análise do esfregaço corado com panótico foi negativa em 20 amostras de aspirado de medula e/ou creme leucocitário do sangue periférico. Este último resultado pode ser explicado pela sensibilidade variável da análise do esfregaço em lâmina, mesmo em material proveniente de aspirado de medula.⁷⁶ Pacientes com essa afecção podem passar despercebidos devido à baixa parasitemia, com consequente escassez ou ausência de parasitos na amostra,⁶⁶ o que torna a técnica laboriosa e justificando a necessidade da análise do material ser realizada por profissionais devidamente capacitados.⁶⁹

A cultura em meio NNN, suplementado com BHI, foi realizada em 44 das 82 amostras, de 73 pacientes do Grupo I. Foram cultivadas amostras de aspirado de medula óssea ou creme leucocitário de sangue periférico e 27% (12/44) apresentaram resultado positivo na cultura em meio NNN. No que concerne à coinfeção *Leishmania*/HIV, das 12 amostras positivas na cultura, 2 eram de pacientes HIV negativos, 2 eram HIV positivos e de 8 pacientes não conseguimos informações a respeito dessa coinfeção. López-Vélez et al., (1995),⁶⁴ encontraram sensibilidade de 68% em amostras de creme leucocitário, utilizando o meio Schneider's, suplementado com soro fetal bovino, de 25 pacientes HIV positivos com LV confirmada. Exemplificando ainda mais a baixa sensibilidade da cultura, podemos citar estudo realizado por Kaouech et al., (2008),⁷⁰ com 106 amostras, 53 procedentes de aspirado de medula óssea e 53 de creme leucocitário de sangue periférico de crianças HIV negativas com suspeita clínica de LV, no qual obtiveram 55,6% (59/106) de sensibilidade na cultura. Sendo assim, podemos afirmar que a cultura pode complementar a investigação da LV, porém é um método de

baixa sensibilidade, além de dispendioso e demorado, não sendo apropriado para utilização isolada para o diagnóstico de LV.

Em amostras de soro de indivíduos imunocompetentes assintomáticos e sintomáticos podem ser encontrados altos níveis de anticorpos anti-*Leishmania*. No entanto, tais níveis podem permanecer positivos durante anos, não podendo ser utilizado como indicador de atividade da doença.¹⁷ Em indivíduos coinfectados com *Leishmania*/HIV, a utilização de testes compostos por antígenos recombinantes ou brutos apresentam baixa sensibilidade, sendo recomendada a execução de outras provas antes do diagnóstico de LV ser descartado.¹⁵ Há ainda a possibilidade de reações cruzadas, independentemente da procedência das amostras, se de humanos⁷³ ou de cães.⁷⁴

Diversos estudos apontam para a alta sensibilidade e especificidade do teste imunocromatográfico rk39 (Irk39),^{56,75} que é sintetizado, tendo como antígeno a proteína recombinante k39 específica do complexo *donovani* expressa em *Escherichia coli*.¹¹⁷ Portanto, tal ensaio é considerado específico para o diagnóstico da LV para alguns autores.²³ No entanto, há relato de falso-positivo para o teste, como no estudo de Amato-Neto et al., (2009),⁷³ no qual o ensaio foi positivo em um paciente com sorologia positiva para a doença de Chagas, infecção que também é causada por um tripanossomatídeo. Além disso, os autores também demonstraram a positividade do teste em 4 amostras de soro de pacientes com LT confirmada mediante testes parasitológicos. Romero et al., (2009),¹¹⁸ encontraram reatividade cruzada em amostras de pacientes com doença de Chagas, LT e malária. Ao ser aplicado em amostras do Grupo 1, que compreende pacientes com LV confirmada, o Irk39 foi positivo em 76,4% (55/70) delas. Dentre as amostras de pacientes coinfectados por *Leishmania*/HIV, 60% (15/25) foram positivas no Irk39. Tal resultado corrobora achados de outros autores, nos quais o rk39 teve sensibilidade diminuída devido à presença de imunodeficiência, podendo chegar a 45%.¹⁵ Embora muitos estudos demonstrem boa sensibilidade para o teste imunocromatográfico rk39, Moura et al., (2013)¹¹⁹, encontraram uma sensibilidade de 72,4% (105/145) em amostras de pacientes com LV confirmada. Nesse mesmo estudo, ao considerarem os resultados obtidos no ensaio imunocromatográfico em amostras de pacientes coinfectados com *Leishmania*/HIV obteve-se 60% de

sensibilidade e 100% de especificidade. De acordo com Cunningham et al., (2012),¹²⁰ devido à variabilidade encontrada no emprego de vários tipos de testes, são necessárias avaliações mais elaboradas antes da exclusão de suspeita de LV devido ao Irk39 negativo. Em áreas endêmicas para a LV, a sensibilidade e a especificidade são diminuídas em amostras de pacientes que apresentam imunodeficiências, sendo necessária a complementação destes testes por ensaios moleculares e parasitológicos para a confirmação de LV.²³ Khan et al., (2014),⁷⁵ ao analisarem creme leucocitário de amostras sanguíneas de pacientes procedentes de área endêmica para LV em Bangladesh, encontraram especificidade de 84% (21/25) com o Irk39. Embora publicações mais antigas afirmem que o teste imunocromatográfico rk39 seja indicativo da atividade da doença,¹¹ mais recentemente constatou-se que tal ensaio não tem essa capacidade, conforme demonstrado por Singh, Sundar & Mohapatra (2009),¹²² cujo estudo mostrou que todos os 50 pacientes submetidos a tratamento foram acompanhados e tiveram positividade no Irk39 até a última avaliação, realizada 180 dias após a cura clínica para LV. Em nosso estudo, das 16 amostras de pacientes em tratamento da LV (Grupo IV), 81,2% (13/16) foram positivas no Irk39. Acerca dos 3 pacientes com Irk39 negativo, é sabido apenas que 1 deles é paciente imunodeprimido, e não conseguimos obter informações a respeito dos outros dois.

Das 6 amostras procedentes de 5 pacientes do Grupo I, com resultados negativos ou dos quais não se tem informação a respeito da realização dos ensaios parasitológicos e do Irk39, há critérios clínicos e epidemiológicos que contribuem para a definição de paciente com LV confirmada, de acordo com informações obtidas no prontuário.

Dentre as vantagens da utilização das técnicas moleculares estão: 1) a possibilidade de identificação da doença em atividade, como no caso de relapsos e reinfecções;^{65,79} 2) a possibilidade de utilização de diversos tipos de amostras, sem comprometimento da sensibilidade da metodologia. Ao comparar a PCR (iniciadores HM1, HM2 e HM3) em amostra de sangue periférico, com a análise parasitológica, em aspirado de medula óssea, de 45 crianças do Mato Grosso do Sul com suspeita de LV, Fraga et al. (2010)⁷⁸, obtiveram positividade de 95,6% da PCR, sendo esta superior à encontrada na análise microscópica do esfregaço (80%) e cultura (26,7%). A

sensibilidade da kDNA PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores 13 A e 13 B, foi superior (58% - 29/50) à encontrada no exame microscópico do sangue (20% - 10/50) e ao teste imunocromatográfico rK39 (24% - 12/50), no estudo de Ozerdem et al. (2009),⁷⁷ em 50 amostras de sangue periférico, procedentes de pacientes com suspeita de LV, provenientes da Turquia. Ao analisarmos a sensibilidade da kDNA PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores K20 e K22, obtivemos uma sensibilidade de 98% (47/48). Devido à insuficiência de volume, as 34 amostras oriundas do Mato Grosso do Sul não foram analisadas com os oligonucleotídeos iniciadores K20 e K22, e diante disso, avaliamos 48 das 82 amostras de pacientes com LV confirmada (Grupo 1). Utilizando a kDNA PCR, com oligonucleotídeos iniciadores degenerados similares ao K20 e K22, Disch et al., (2003),⁷⁶ obtiveram 91% (48/53) de sensibilidade em sangue periférico de 53 pacientes com LV ativa.

Quando analisamos a kDNA PCR RV1-RV2 nas 82 amostras (Grupo 1), obtivemos uma sensibilidade de 92,6% (76/82). Lachaud et al., (2002),¹²³ utilizando os oligonucleotídeos iniciadores RV1 e RV2 em amostras de cães sintomáticos e assintomáticos para LV, obtiveram bons resultados com o limiar de detecção igual a 10^{-3} parasitos/ml, sendo que nos sintomáticos com sorologia positiva houve 100% de sensibilidade. Gomes et al., (2006),⁵⁹ afirmam que o emprego da kDNA PCR RV1-RV2 possibilita a definição da espécie *L. (L.) chagasi*, syn de *L. (L.) infantum*, em amostras de pacientes, já que não obtiveram amplificação para *L. (L.) amazonensis*. No estudo de Lima-Júnior et al., (2009),¹¹⁴ foi possível a identificação da espécie causadora de leishmaniose em isolados de amostras de 37 pacientes, dos quais 35 foram positivos, na kDNA PCR RV1-RV2, tida como específica para amplificação de *L. (L.) chagasi/infantum*. Uma das amostras negativas obteve amplificação mediante o emprego dos oligonucleotídeos iniciadores b1 e b2, sendo utilizados para a identificação de *L. (V.) braziliensis* e a outra, com o emprego dos oligonucleotídeos iniciadores a1 e a2, utilizados para a identificação de *L. (L.) amazonensis*. Carnaúba Jr. et al., (2006)²⁴ descreveram caso de paciente procedente de Pernambuco, coinfectado com *Leishmania*/HIV, submetido a tratamento anterior para LV confirmada, com positividade em análise de aspirado de medula óssea. Na ocasião, descrita com lesões similares à PKDL, nas quais foi encontrada positividade na kDNA PCR RV1-RV2,

interpretada pelos autores como ferramenta para definição da espécie *L. (L.) infantum chagasi*, sinônimo de *L. (L.) infantum*. Diferentemente de Gomes et al., (2006),⁵⁹ obtivemos amplificação de DNA de amostra oriunda de cepa referência de *L. (L.) amazonensis*, que pertence ao mesmo subgênero de *L. (L.) infantum*, sendo assim, podemos afirmar que foi possível, mediante o emprego dos oligonucleotídeos iniciadores RV1 e RV2, a definição até o subgênero *Leishmania*.

Em estudo conduzido por Khan et al., (2014),⁷⁵ no qual foram analisadas técnicas diagnósticas em amostras de creme leucocitário de sangue periférico e soro, o teste imunocromatográfico rk39 e a ITS1 PCR obtiveram sensibilidades muito próximas, sendo de 98,4% (60/61) e 96,7% (59/61), respectivamente. E quando comparada à detecção microscópica do parasito, mediante análise de esfregaço de aspirado esplênico, a ITS1 PCR obteve 96,7% de sensibilidade e 98,7% de especificidade. Em nosso estudo, a sensibilidade da ITS1 em amostras oriundas de pacientes com LV aumentou de maneira significativa após a otimização e padronização das condições de trabalho da ITS1 PCR, partindo-se do estabelecido por Schönian et al. (2003),⁸⁰ já que anteriormente poucas amostras haviam amplificado. Aumentamos o número de ciclos de 35 para 40, a concentração de cloreto de magnésio de 1,5 mM para 4 mM, e diferentes temperaturas de anelamento foram testadas. Diversos autores demonstraram elevada sensibilidade da ITS1 PCR utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores do presente estudo e as mesmas condições de Schönian et al., (2003).⁸⁰ Utilizando a “nested” ITS1 PCR, com oligonucleotídeos iniciadores diferentes na 2ª amplificação, Carvalho Ferreira et al., (2014)⁸⁴ obtiveram alta sensibilidade (96,7% - 29/30) em amostras de medula óssea e swab conjuntival (90% - 27/30) de cães assintomáticos e sintomáticos para LV causada por *L. (L.) infantum*. A ITS1 PCR detectou todos os pacientes verdadeiramente positivos para essa afecção (44/44) em amostras de pacientes com LT, em estudo de Moutakki et al.,(2014).¹⁰² Assim como em nosso estudo, outros autores optaram pela padronização de diversas condições da ITS1 PCR: a amplificação em 40 ciclos utilizada por Odiwor et al., (2011),¹²⁵ Roelfsema et al., (2011)⁹⁹ e Moutakki et al., (2014) ;¹⁰² a utilização de maior concentração de MgCl₂ e Taq DNA polimerase e “nested” PCR padronizada, para estabelecimento de um padrão no estudo de Silva et al., (2013) ;¹¹³ ou até mesmo o

aumento da concentração de oligonucleotídeos iniciadores, como 1µM utilizado por Khan et al., (2014).⁷⁵

Após a padronização das condições da ITS 1 PCR obtivemos uma sensibilidade de 97,5% (80/82) em amostras de pacientes do Grupo I. Utilizando o mesmo par de oligonucleotídeos iniciadores da ITS1 PCR do presente estudo, em condições padronizadas da temperatura de anelamento (55°C) e aumento do número de ciclos (40), Roelfsema et al., (2011)⁹⁹ encontraram 100 % (50/50) de sensibilidade da ITS1 PCR em amostras de sangue e aspirado de medula óssea de pacientes com LV. Analisando aspirado de medula presente em lâminas coradas com Giemsa, e utilizando as mesmas condições de Schonian et al., (2003),⁸⁰ Parvizi et al., (2008)⁹⁷ encontraram positividade pela ITS1 PCR em 43 das 48 amostras analisadas. Com essas mesmas condições, Mahdy et al., (2016)¹²⁶ encontraram sensibilidade de 61% (25/41) em lâminas coradas de aspirado de medula de crianças, do Yêmen, com LV confirmada.

Uma especificidade de 100% (Grupo II) foi obtida em todas as reações moleculares empregadas no presente estudo: ITS1 PCR, kDNA PCR K20-K22 e kDNA PCR RV1-RV2. Para análise de amplificação inespecífica em amostras de diferentes patógenos (Grupo VIII), observamos que a ITS1 PCR não apresentou amplificação quando testada nas amostras dos patógenos do Grupo VIII. Alguns estudos testaram tais oligonucleotídeos iniciadores com cepas de *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *S. mansoni*, *Wuchereria bancrofti* e *T. cruzi*. e também não obtiveram amplificação inespecífica para este par de oligonucleotídeos iniciadores, demonstrando a importância do alvo em termos de especificidade analítica.^{27,127} Porém, há relatos de amplificação do DNA de alguns tripanossomatídeos, incluindo *T. cruzi*.^{24,91}

Com a kDNA PCR K20-K22 obteve-se amplificação de 120 pb nas amostras de *M. tuberculosis*, *S. mansoni*, *T. gondii* (cepas RH e ME45) e *P. falciparum*. Tal resultado é preocupante, uma vez que a tuberculose, a esquistossomose, a toxoplasmose e a malária ocorrem em diversas regiões do Brasil.^{87,128} No estudo de Satow (2016),⁹¹ que utilizou oligonucleotídeos iniciadores similares ao da kDNA PCR K20-K22, obteve-se amplificação em amostras de diversos tripanossomatídeos, incluindo *T. cruzi*.

A kDNA PCR RV1-RV2 obteve amplificação dos 145 pb em amostra de *Schistosoma mansoni*, um dos patógenos do Grupo VIII. Estudo de Wanderley, (2011),

¹²⁴ confirma nosso achado, já que também obteve amplificação em amostra deste helminto na kDNA PCR RV1-RV2, no entanto, obteve também a amplificação do tripanossomatídeo *T. cruzi*, diferentemente do nosso estudo.

Ao compararmos as sensibilidades dos iniciadores, quando testados nas amostras do Grupo I, a kDNA PCR K20-K22 foi superior (98%) à ITS1 PCR (97,5%) e à kDNA PCR RV1-RV2 (92,6%), no entanto, essa diferença não foi significativa ($p < 0,001$). Sabe-se que o kDNA está presente em 10^4 cópias por célula de *Leishmania* e a região ITS1 em 20 a 200 cópias por célula de *Leishmania*.^{85, 104} É sabido que o aumento do número de ciclos da PCR aumenta o número de produtos de amplificação ao final da reação, assim como o emprego da “nested PCR”,⁸⁰ e o aumento da concentração de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) confere maior sensibilidade ao ensaio, uma vez que essa substância age como cofator da enzima *Taq* DNA polimerase. Em nosso estudo, a sensibilidade encontrada com o emprego dos oligonucleotídeos iniciadores da ITS1 foi similar à encontrada com os alvos da kDNA PCR, embora estes sejam encontrados em grande quantidade nos minicírculos nas células de *Leishmania*. Isso pode ser explicado pela otimização das condições padronizadas para a ITS1 PCR, o que aumentou de maneira significativa a sensibilidade deste ensaio. Em estudo realizado por Leite et al. (2010),¹²⁹ utilizando amostras obtidas da conjuntiva de cães com LV confirmada, a sensibilidade da kDNA, com oligonucleotídeos iniciadores degenerados, e da ITS1- “nested” PCR foi de 90% e 83,3%, respectivamente, e, em amostra sanguínea, a sensibilidade encontrada foi de 13,3% e 56,7%, respectivamente. No estudo de Ranasinghe et al., (2015)¹⁹, com amostras de pacientes com suspeita clínica de LT, a kDNA PCR com os oligonucleotídeos JW11/12 e a ITS1 PCR com os oligonucleotídeos iniciadores LITSR e L5.8S obtiveram 92,1% (35/38) de sensibilidade. No entanto, ao avaliarem o limiar de sensibilidade, a ITS1 PCR detectou 10 fg de DNA por mL, enquanto que a kDNA PCR detectou 100 fg de DNA, o equivalente a 0,1 e 1 parasito, respectivamente, demonstrando maior sensibilidade analítica do primeiro.¹⁹ O estudo de Ranasinghe et al., (2015),¹⁹ confirma os resultados obtidos na avaliação da sensibilidade analítica do presente estudo, no qual a ITS1 PCR kDNA obteve maior sensibilidade analítica do que o kDNA PCR K20-K22, detectando até 1 fg de DNA por mL, frente à detecção de até 100 fg de DNA encontrada na kDNA PCR K20-K22.

Ao contrário de nosso estudo, Mohammadiha et al., (2013) ,⁶⁰ obteve sensibilidade de 53,7% (44/82) em amostras humanas e 72,2% (52/72) em amostras caninas com a ITS1 PCR , menor do que a obtida na kDNA PCR RV1-RV2, que foi de 75,6% (62/82) em amostras humanas e 88,9% (64/72) em caninas. Fallah et al. (2011)¹³⁰ avaliaram 60 amostras de cães com suspeita de LV, detectando positividade em 7 na kDNA, 3 no ELISA e 2 na ITS. Em nosso estudo, das 48 amostras analisadas em ambos os ensaios, a kDNA PCR RV1-RV2 foi positiva em 87,5% (42/48) e a kDNA PCR K20-K22 em 97,8% (47/48). Ambas obtiveram 100% de especificidade em amostras de indivíduos saudáveis. No entanto, em termos de especificidade analítica em amostras de patógenos, a kDNA PCR K20 - K22 mostrou ser menos específica que a kDNA PCR RV1-RV2, uma vez que a primeira obteve amplificação em amostras de 4 patógenos (*M. tuberculosis*, *S. mansoni*, *T. gondii* (cepas RH e ME45) e *P. falciparum*.) e a segunda obteve amplificação em 1 patógeno (*S. mansoni*) diferente de *Leishmania*. Isso pode ser explicado pela utilização de oligonucleotídeos iniciadores K20 e K22 degenerados, o que sabidamente contribui para a diminuição da especificidade do ensaio, consequentemente aumentando a sensibilidade.¹³¹ A heterogeneidade presente nas sequências de kDNA, além de facilitarem o aparecimento de amplificações inespecíficas, dependendo do fragmento escolhido, pode também apresentar relação com ausência de amplificação em isolados de diferentes cepas de uma mesma espécie de *Leishmania*, o que pode explicar esse fenômeno com a kDNA PCR RV1-RV2 em algumas amostras.¹³²

Todos os ensaios obtiveram 100% de especificidade em amostras de indivíduos saudáveis e 100% de valor preditivo positivo, ressaltando ainda mais a especificidade dos ensaios empregados em amostras de pacientes com LV confirmada. Os valores preditivos negativos foram de 96,7% para a kDNA PCR K20-K22, 93,37% para a ITS1 PCR e 83,3% para a kDNA PCR RV1-RV2, demonstrando que na amostragem considerada para o cálculo, a kDNA PCR K20-K22 apresentaria maior probabilidade de, perante um resultado negativo, provar não haver doença. No que concerne à probabilidade de resultado falso negativo, os índices obtidos de 0,02, 0,025 e 0,0732, respectivamente, referentes ao kDNA PCR K20-K22, à ITS1 PCR e kDNA PCR RV1-

RV2, são indicadores de probabilidade de se excluir a doença quando os resultados são negativos.

Segundo Graça et al.,(2012) ¹⁰⁶ as discrepâncias entre as reações de PCR que comparam diferentes alvos moleculares podem estar relacionadas com a diferente distribuição de DNA na amostra.

Analizados em conjunto, os três ensaios de PCR: ITS1 PCR (LITSR e L5. 8S), kDNA PCR K20-K22 e kDNA PCR RV1-RV2 obtiveram concordância quase perfeita quando comparados ao padrão-ouro.

De acordo com as tabelas **10** e **13**, das 48 amostras analisadas e comparadas quanto ao resultado obtido acerca da positividade, pela ITS1 PCR e kDNA PCR K20-K22, houve concordância em 93,7% (45/48). Em 3 amostras houve discordância entre a kDNA PCR K20-K22 e a ITS1 PCR. Em 2 amostras negativas na ITS1 PCR, a kDNA PCR K20-K22 foi positiva. As duas apresentaram teste parasitológico negativo, uma apresentou positividade no teste imunocromatográfico e outra foi negativa, provavelmente por ser de paciente coinfetados com *Leishmania*/HIV. Além disso, essas amostras foram positivas na kDNA PCR-RV1 e RV2. Uma amostra foi positiva na ITS1 PCR e negativa na kDNA PCR K20-K22.

Quando comparados os resultados da ITS1 PCR com os da kDNA PCR RV1-RV2 em 82 amostras, e de acordo com as tabelas **10** e **14**, houve concordância em 90,2% (74/82) acerca da positividade. Houve discordância em 9,75% (8/82) das amostras. Em 2, a ITS1 PCR foi negativa e a kDNA PCR RV1-RV2 positiva. Essas duas amostras também foram positivas na kDNA PCR K20-K22. Seis amostras foram positivas na ITS1 PCR e negativas na kDNA PCR RV1-RV2. Três dessas amostras foram positivas nos testes parasitológicos, das quais 1 teve resultado positivo em esfregaço sanguíneo. Em 3 amostras o teste IrK39 foi positivo. Em 5 dessas 6 amostras, a ITS1 PCR RFLP obteve padrão similar à *L. (L.) infantum*. A amostra cujo perfil não foi possível definir por RFLP, apresentou positividade no teste Irk39, e foi negativa nos testes parasitológicos.

Quando comparados os resultados da kDNA PCR RV1-RV2 com os da kDNA PCR K20 - K22, de acordo com as tabelas **10** e **15**, houve concordância na positividade em 85,4% (41/48) das amostras analisadas. Em 14,6% (7/48) das amostras houve

discordância entre os resultados obtidos na kDNA PCR RV1-RV2 e na kDNA PCR K20-K22, sendo que 6 amostras negativas na kDNA PCR RV1-RV2 foram positivas na kDNA PCR K20-K22. Essas 6 amostras foram positivas na ITS1 PCR e correspondem às positivas na ITS1 PCR e negativas na kDNA PCR RV1-RV2.

Para identificação de espécie, propusemos a definição de um algoritmo para o diagnóstico molecular espécie-específico da LV por meio da utilização dos oligonucleotídeos iniciadores LITSR e L5.8S (ITS1-PCR). Sendo assim, mediante o emprego da técnica de análise de polimorfismo por RFLP, com a enzima de restrição *Hae* III (RFLP), em produtos da ITS1 PCR, seria possível definir a espécie envolvida. Como técnica padrão-ouro para a identificação de espécies de *Leishmania* existe a eletroforese de enzimas multilocus (da sigla em inglês MLEE), no entanto, é método dispendioso e laborioso, que exige cultivo do parasito antes de sua execução. Como alternativa para a utilização da MLEE, existe a técnica de análise de polimorfismos por RFLP, que não necessita do parasito vivo, e, portanto, nem de seu cultivo em meio de cultura. A ITS1-RFLP é amplamente utilizada em estudos que envolvem as leishmanioses, tanto no Velho como no Novo Mundo.^{89,90,99,102,103} Essa metodologia é muito importante em pacientes coinfectados com *Leishmania*/HIV pois permite, diante da diversidade clínica demonstrada por grande parte destes indivíduos, a identificação de espécies sem a utilização da laboriosa técnica de MLEE.²⁶ Na literatura há também descrição de casos de LT canina, cujo agente etiológico identificado é a *L. (L.) infantum*. Portanto, é de extrema importância a identificação de espécies em amostras de cães com suspeita de leishmaniose sob os aspectos da vigilância epidemiológica, uma vez que os casos caninos precedem os humanos. Além disso, as lesões cutâneas em cães podem ser atribuídas a diversos patógenos, cuja detecção de infecção por estes não é precedida de eutanásia do animal.⁵² Andrade et al., (2006),⁸⁹ realizaram a detecção de *Leishmania* sp e identificação das espécies *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* em amostras de cães oriundos de regiões endêmicas para LV e LT, por meio da kDNA PCR RFLP, permitindo diagnóstico diferencial em localidades nas quais diversas espécies de *Leishmania* são encontradas. No trabalho de Lyra et al. (2015),⁸² foi realizada PCR de aspirado de medula, amostra padrão-ouro para o diagnóstico de LV, e biópsia de

coinfectados com *Leishmania*/HIV, e obteve-se 60% de sensibilidade e 100% de especificidade. De acordo com Cunningham et al., (2012),¹²⁰ devido à variabilidade encontrada no emprego de vários tipos de testes, são necessárias avaliações mais elaboradas antes da exclusão de leishmaniose cutânea-difusa. Outro exemplo desta situação foi o caso descrito na Bolívia por Martinez et al., (2002)¹³³, quando na infecção de leishmaniose cutânea-difusa estavam presentes na pele do paciente, criança de 5 anos, as espécies *L. (L.) infantum* (viscerotrópica) e *L. (L.) amazonensis* (dermotrópica), definidas pelo MLEE. Tal paciente não apresentou sintomatologia relacionada com LV.

Análises da sequência ITS1 de *Leishmania* evidenciam a presença de regiões variáveis entre as espécies que ocorrem no Velho e no Novo Mundo, tornando possível a distinção de espécies com o emprego de 1 ou 2 enzimas de restrição.^{80, 108} A análise dos polimorfismos por RFLP com *Hae* III dos produtos da ITS1 PCR em amostras com LV possibilitou a demonstração do agente etiológico como pertencente ao complexo *L. donovani*, uma vez que não foi possível distinguir as espécies de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*, mesmo utilizando gel de alta resolução. Diferentemente do observado por Schönian et al., (2003),⁸⁰ que conseguiu diferenciar as duas espécies mediante a utilização de agarose Metaphor, a mesma empregada no presente estudo. No entanto, sabe-se que o agente etiológico encontrado no continente americano é o *L. (L.) infantum*.⁸⁴ No estudo de Roelfsema et. al., (2011),⁹⁹ o padrão da técnica de RFLP em produtos da ITS1 obtido para a espécie *L. (L.) mexicana*, responsável por LT, foi similar ao de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*. Conforme apresentado na **Tabela 10**, das 80 amostras positivas na ITS1 PCR, 52,5% (42/80) demonstraram o perfil similar ao de *L. (L.) infantum*. A distinção entre as espécies do subgênero *Viannia* e *Leishmania* ficou muito clara, mesmo sem a utilização de gel de alta resolução. No entanto, para o diagnóstico etiológico das leishmanioses como um todo é sugerida a utilização de enzimas que permitam a distinção entre espécies pertencentes a um mesmo subgênero.¹⁰⁶ Para Graça et al., (2012),¹⁰⁶ o emprego dos oligonucleotídeos iniciadores da ITS1 PCR validou a identificação das espécies causadoras de LT feita por MLEE, com apenas uma exceção utilizando a enzima *Sau*3AI, que segundo os autores obtém resultados equivalentes aos encontrados para a enzima *Hae* III. Ranashinghe et al., (2015),¹⁹ em estudo com pacientes do Sri Lanka com suspeita de LT, conseguiram

definir por meio da ITS1 PCR RFLP com a enzima *Hae* III, que *L. (L.) donovani* era o agente da LT presente nas lesões cutâneas dos pacientes. Monroy-Ostria et al., (2014),¹⁰³ ao testarem a ITS1 PCR RFLP com *Hae* III em amostras de pacientes com LT, do México, obtiveram excelente distinção entre as espécies responsáveis por essa doença. A geração de baixa quantidade de amplicons de 320 pares de base, provavelmente pode ter relação com a baixa carga parasitária,¹³⁴ possibilitando explicar a ausência de definição das espécies mediante a utilização da ITS1 RFLP em 48,7% (39/80) de nossas amostras positivas na ITS1 PCR.

Numa tentativa de avaliar as amostras nas quais não estava sendo possível definir a espécie envolvida, a partir da RFLP em produtos da ITS1 PCR, decidimos avaliar a kDNA PCR RFLP com a enzima *Hae* III. Como referência, utilizamos literatura que afirma sucesso com os oligonucleotídeos iniciadores degenerados do kDNA na técnica de análise do polimorfismo por RFLP, com a enzima *Hae* III, em amostras de cães naturalmente infectados por *Leishmania* em inquérito epidemiológico.^{89, 90, 91} No estudo de Castro et al., (2016),¹¹ foi realizada kDNA RFLP com oligonucleotídeos iniciadores similares ao K20 e K22, com emprego da enzima de restrição *Hae* III, em produtos de amostras procedentes de lâminas de pacientes com leishmaniose cutânea confirmada. Os autores relataram a presença de *L. (L.) infantum* como agente etiológico da leishmaniose cutânea nestes pacientes.

Verificamos que a RFLP dos produtos da kDNA PCR obteve padrões similares aos da cepa referência de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445). No entanto, mesmo no gel de alta resolução utilizado no presente estudo, a distinção das amostras não ficou muito clara, dificultando a interpretação dos resultados. Assim como em nosso estudo, Castro et al., (2016),¹¹ também relatam a presença de padrões inconclusivos em sua técnica de análise do polimorfismo por RFLP. O aparecimento da banda de 120 pb na kDNA RFLP, pode ser indicativo de digestão parcial da enzima *Hae* III, conforme encontrado também no estudo de Martins (2013).⁹⁰ Portanto, embora tenha obtido correspondência com a cepa de *L. (L.) chagasi*, não recomendamos a utilização da técnica de análise de polimorfismos por RFLP com produtos da kDNA PCR K20-K22.

Quando da análise das amostras do Grupo III, que compreende 47 amostras de 47 pacientes com suspeita de LV, com algum traço clínico e epidemiologia positiva

para LV, os ensaios ITS1 e kDNA PCR K20-K22 demonstraram sua especificidade, não obtendo nenhuma amplificação. Essas amostras não foram testadas na kDNA PCR RV1-RV2. Quando submetidos ao teste imunocromatográfico que emprega o antígeno recombinante rk39, 100% (47/47) das amostras foram negativas. Em ensaios sorológicos é possível que a análise de amostras de pacientes oriundos de área endêmica possam apresentar resultados falso-positivos, como no caso de Khan et al., (2014).⁷⁵ No entanto, no presente estudo nenhuma amostra desse grupo obteve resultado falso-positivo com o teste imunocromatográfico.

As 16 amostras pertencentes ao Grupo IV, que corresponde a pacientes em tratamento, foram negativas na kDNA PCR K20-K22, sendo 2 positivas na ITS1 PCR e 4 positivas na kDNA PCR RV1-RV2. Desse modo, 37,5% (6/16) das amostras dos pacientes em tratamento para LV foram positivas na PCR. No que diz respeito às amostras positivas na ITS1 PCR, não foi possível discutir 1 caso, pois o prontuário do paciente não foi encontrado. No que concerne à outra amostra positiva, ela fora coletada um mês após o diagnóstico de LV, e foi feita para controle do tratamento diante da cura clínica observada pelo corpo médico. Ainda, em correspondência à análise dos arquivos médicos a respeito da positividade encontrada na kDNA PCR RV1-RV2 em uma das amostras, verificamos que no momento da realização do teste molecular, o paciente estava fazendo controle de tratamento para LV. No entanto, um mês depois, a LV reativou e essa afecção foi detectada pelos métodos parasitológicos e moleculares, com posterior definição do agente etiológico pela ITS1 PCR RFLP. As outras 3 foram positivas em momentos em que a cura clínica dos pacientes estava presente, ou seja, tais pacientes não apresentavam mais sintomatologia relacionada com LV. Tais situações demonstram a alta sensibilidade da kDNA PCR RV1-RV2, como a encontrada por Lachaud et al., (2002),¹²³ mesmo em amostras com número reduzido de parasitos.

Dada a importância do papel do reservatório canino no ciclo das leishmanioses, principalmente a LV, é de suma importância a identificação das espécies envolvidas nas suspeitas de infecção por estes parasitos em amostras caninas.³⁹ Gomes et al., (2006),⁵⁹ obtiveram positividade de 100% em amostras de cães com diagnóstico parasitológico positivo para as leishmanioses, com o emprego dos oligonucleotídeos iniciadores RV1 e RV2, e de 92% com os ensaios parasitológicos. Em nosso estudo, encontramos

positividade de 86% (12/14) com a ITS1 PCR, de 28,57% (4/14) com a kDNA PCR K20-K22 e de 86% (12/14) na kDNA PCR RV1-RV2, em amostras de aspirado de medula óssea de cães. Acreditamos que a baixa positividade detectada com os oligonucleotídeos iniciadores K20 e K22 possa ter relação com a utilização de oligonucleotídeos degenerados, uma vez que a positividade com o outro par de oligonucleotídeos iniciadores do kDNA, RV1 e RV2, foi similar à encontrada para a ITS1 PCR. Muitos estudos voltados para o diagnóstico molecular da LVC, assim como o de Martins (2013) ⁹⁰ encontram sensibilidade variada a depender do tipo de amostra analisada, no entanto, utilizamos apenas um tipo de amostra para todas as análises realizadas, o aspirado de medula óssea. Regina-Silva et al., (2015), ¹³⁵ utilizando oligonucleotídeos iniciadores similares aos empregados na kDNA PCR K20-K22, encontraram positividade em apenas 64% (28/44) das amostras caninas com LVC definida pelos ensaios sorológicos, preconizados pelo Ministério da Saúde para diagnóstico da LVC. Esse estudo corrobora a baixa positividade que encontramos nesse ensaio de PCR nas amostras caninas com a kDNA PCR K20-K22. No entanto, o mesmo resultado não foi observado com os outros pares de oligonucleotídeos iniciadores (ITS1 PCR e kDNA PCR RV1-RV2), que apresentaram positividade de 86%, cujo resultado foi similar nas mesmas amostras para os dois ensaios. Ferreira et al., (2014), ⁸⁴ realizaram a ITS1 PCR RFLP com os mesmos oligonucleotídeos iniciadores empregados no presente estudo, em amostras de 10 cães com LV confirmada, e obtiveram sucesso no diagnóstico molecular e identificação gênero-específica de todas as amostras.

Em análise de amostra de flebotômico infectado com sangue de cão com LV (Grupo VI), a ITS1 PCR, da kDNA PCR RV1-RV2 e da kDNA PCR K20-K22, obtiveram amplificação de seu fragmento correspondente. Na ITS1 PCR RFLP e na kDNA PCR RFLP, com os oligonucleotídeos iniciadores K20 e K22, a amostra apresentou perfil semelhante ao de *L. (L.) infantum*.

Das 18 amostras pertencentes ao Grupo VII, de pacientes com LT confirmada, 5 foram testadas no Irk39 e obtiveram resultado negativo, 72% (13/18) foram positivas na ITS1 PCR. As 13 amostras positivas demonstraram perfil eletroforético similar ao encontrado para *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) guyanensis*.

Amro et al., (2012),¹³⁶ descreveram possível inibição ou falha na amplificação da ITS1 PCR em amostras de pacientes com LT, do Velho Mundo. Roelfsema et al., (2011),⁹⁹ afirmaram que para a distinção de parasitos pertencentes ao subgênero *Viannia*, encontraram melhores resultados mediante a utilização da identificação de espécies com o gene do minixon. Ainda em referência às 18 amostras dos pacientes com LT confirmada, 100% (18/18) foram positivas quando analisadas na kDNA PCR K20-K22. No entanto, neste ensaio com a kDNA RFLP apenas uma das amostras amplificadas obteve um perfil passível de análise, com similaridade aos padrões encontrados para *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) guyanensis*. Volpini et al.,(2004)⁸⁰ ao analisarem 66 amostras de pacientes com LT confirmada, obtiveram 100% de especificidade utilizando oligonucleotídeos iniciadores similares aos empregados na kDNA PCR K20-K22 do presente estudo. Os oligonucleotídeos iniciadores da kDNA PCR, empregados no estudo de Graça et al.,(2012),¹⁰⁶ são similares ao da kDNA PCR K20-K22 e foram utilizados como alvo para a detecção de *Leishmania* sp em amostras de pacientes com LT, demonstrando a sensibilidade de tais oligonucleotídeos iniciadores em amostras de pacientes com essa afecção. Essa sensibilidade em amostras de pacientes com LT fica evidente também no estudo de Satow et al., (2013),⁹¹ que utilizaram oligonucleotídeos iniciadores similares aos nossos. Analisadas as 18 amostras na kDNA PCR RV1-RV2, 11% (2/18) foram positivas, e dessas, tivemos acesso a apenas 1 prontuário. Infelizmente não foi possível extrair muitas informações deste arquivo, pois não havia dados a respeito de coinfeção com HIV. Tal paciente foi diagnosticado como positivo para LT mediante a demonstração de *Leishmania* na cultura de sangue periférico e na kDNA PCR de amostra procedente de tecido. Essa amostra também fora positiva na kDNA PCR com os oligonucleotídeos iniciadores K20 e K22 e ITS1, porém não foi possível definição de espécie. Na literatura consultada^{24,92,114} a kDNA PCR RV1-RV2 é mencionada como específica para a amplificação de *L. (L.) infantum*.

No que concerne à utilização do Gelbot para a ITS1 PCR, foram visualizados fragmentos de 318 pares de base para a cepa de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) e de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445). Na técnica de análise do polimorfismo de fragmentos por RFLP, os produtos da ITS1 PCR de *L. (L.)*

amazonensis (MHOM/BR/1973/M2269), *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/81/M6445) e *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/72/strain46) foram de 186 e 40 pares de base e 182, 73 e 53 pares de base, respectivamente. Embora seja uma técnica promissora, não prosseguimos com a análise das amostras com o Sistema Automatizado de Eletroforese Capilar – Gelbot já que não havia tempo hábil. No entanto, essa tecnologia deverá ser utilizada em um próximo momento com planejamento e disponibilidade de recursos, pois consiste em método alternativo para corrida eletroforética, sem a necessidade de manipulação de produtos de PCR, gel de agarose, brometo de etídio, etc, garantindo maior agilidade no procedimento e representa menor risco aos técnicos. Realizaremos a análise dos produtos da ITS1 PCR das amostras de diferentes cepas de *Leishmania* e pacientes com LV (Grupo I), bem como da ITS1 PCR RFLP das diferentes cepas de *Leishmania* e pacientes com LV (Grupo I).

Ao decidirmos pelo sequenciamento de algumas das amostras nas quais a ITS1 PCR RFLP não obteve definição de espécie, quando aplicada em produtos que obtiveram a amplificação dos 320 pares de base do alvo ITS1, pretendíamos verificar no DNA da *Leishmania*, algum polimorfismo suficiente para o não reconhecimento das bases específicas para o corte da enzima *Hae* III, “GGCC”. No entanto, ao analisarmos as amostras que obtiveram qualidade para serem analisadas, de acordo com o que é preconizado pelo protocolo de Sanger, não foi detectada mutação na região de corte da enzima *Hae* III. Portanto, a análise por sequenciamento não evidenciou nenhuma possível mutação no sítio de restrição da enzima, e, dessa forma, a provável explicação é que não ocorreu ação da enzima *Hae* III diante de provável insuficiência de amplicons dessas amostras.

Desse modo, finalizamos o presente estudo apresentando uma proposta de um algoritmo de diagnóstico molecular da leishmaniose visceral, que deverá considerar a realização prévia do diagnóstico parasitológico e imunocromatográfico. Sugerindo-se, quando necessária, a realização da kDNA PCR K20-K22 e a kDNA PCR RV1-RV2 para a determinação do gênero e de subgênero da *Leishmania*, respectivamente, e que se complemente com a ITS1 PCR, seguida da ITS1 RFLP para a definição do agente etiológico da leishmaniose visceral.

7. CONCLUSÃO

Nas condições padronizadas para a ITS1 PCR houve a detecção de até 1fg de DNA de *Leishmania*/mL (0,001 parasito/mL) e não houve amplificação de DNA de patógenos cuja clínica pode ser confundida com a de LV, ou que apresentam proximidade filogenética com a *Leishmania*. Nessas condições, a ITS 1 PCR apresentou uma sensibilidade de 97,5%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100%, valor preditivo negativo 93,37%, probabilidade de resultado falso positivo ∞ e probabilidade de resultado falso negativo 0,025.

Ao compararmos sensibilidade e especificidade do ITS1 PCR com os alvos do kDNA, K20 e K22 e RV1-RV2 obtivemos os seguintes valores: sensibilidade de 97,5%, 98% e 92,6%, respectivamente, e a especificidade com os três alvos moleculares foi de 100%.

Após padronização e validação da técnica de ITS1 PCR RFLP definimos a espécie *L.(L.) infantum* em 52,5% das amostras de LV.

Dessa forma, como conclusão geral apresentamos a **Figura 25** com a proposta de um fluxograma de processamento de amostras de pacientes com suspeita de leishmaniose visceral para o diagnóstico molecular da LV ao nível de espécie.

Legenda: Irk39: teste imunocromatográfico rk39; R: kDNA PCR RV1-RV2; K: kDNA PCR K20-K22; NEG: Negativo; POS: Positivo; SIN:sinônimo;

Figura 25 - Algoritmo de processamento de amostras de pacientes com suspeita de LV proposto para o diagnóstico molecular da LV ao nível de espécie.

REFERÊNCIAS

1. Elmahallawy EK, Sampedro Martinez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM et al. Diagnosis of leishmaniasis. J Infect Dev Ctries. 2014 Aug 13;8(8):961-72.
2. Pace D. Leishmaniasis. J Infect. 2014 Nov;69 Suppl 1:S10-8.
3. Távora MP, Pereira MA, Silva VL, Vita GF. [Comparative validation study between the ELISA and RIFI techniques for diagnosing *Leishmania* sp in stray dogs caught in the municipality of Campos de Goytacazes, State of Rio de Janeiro]. Rev Soc Bras Med Trop. 2007 Jul-Aug;40(4):482-3.
4. Saporito L, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C. Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. Int J Infect Dis. 2013 Aug;17(8):e572-6.
5. Silva ES, Pacheco RS, Gontijo CM, Carvalho IR, Brazil RP. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2002 May-Jun;44(3):145-9.
6. Lukes J, Mauricio IL, Schönián G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 May 29;104(22):9375-80.
7. Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010 Apr;8(4):419-33.
8. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva: WHO; 2010 [cited 2015 Apr]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf.
9. Caballero AA, Pinto GC, Oddone VR, de Sanchez MG, De Paula N, Almeida F, et al. Leishmaniasis cutânea atípica por *L. infantum (chagasi)*. An Fac Cienc Med. 2013;46(1):61-7.

10. Brasil. Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde; Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis; Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. Brasília: Ministério da Saúde; 2015.[citado 2016 Mai 28] acessado em 28 de maio de 2016]. 109 p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_diagnostico_leishmania_hiv.pdf
11. Castro LS, França Ade O, Ferreira Ede C, Hans Filho G, Higa Júnior MG, Gontijo CM, et al. *Leishmania infantum* as a causative agent of cutaneous leishmaniasis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2016;58:23.
12. Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Clin Epidemiol. 2014;6:147–54.
13. Varma N, Naseem S. Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. Indian J Hematol Blood Transfus. 2010 Sep;26(3):78-82.
14. Matsumoto PS, de Lima J, Casagrande B. Leishmaniose visceral no Estado de São Paulo: aplicações cartográficas e estatísticas. Hygeia, Rev Bras Geogr Med Saud. 2013;9(17):195-203.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde. 2014.[citado 2015 Jan 10].Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf
16. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade; 2011.[citado 2015 Jan 10].Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leishmaniose_visceral_reducao_letalidade.pdf
17. McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. QJM. 2014 Jan;107(1):7-14.

18. Silva ED, Andrade LD, Araújo PS, Silveira VM, Padilha CE, Silva MA, Medeiros ZM. Case study of a patient with HIV-AIDS and visceral leishmaniasis co-infection in multiple episodes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013 Nov-Dec;55(6):425-8.
19. 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 Dec;110(8):1017-23.
20. Drumond KO, Costa FA. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011 Jan-Feb;53(1):3-11.
21. Zijlstra EE. PKDL and other dermal lesions in HIV co-infected patients with Leishmaniasis: review of clinical presentation in relation to immune responses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Nov 20;8(11):e3258.
22. Boumis E, Chinello P, Della Rocca C, Paglia MG, Proietti MF, Petrosillo N. Atypical disseminated leishmaniasis resembling post-kala-azar dermal leishmaniasis in an HIV-infected patient. *Int J STD AIDS*. 2006;17(5):351-3.
23. Stark D, Pett S, Marriott D, Harkness J. Post-kala-azar dermal leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a human immunodeficiency virus type 1-infected patient. *J Clin Microbiol*. 2006 Mar;44(3):1178-80.
24. Carnaúba D Jr, Konishi CT, Petri V, Martinez IC, Shimizu L, Pereira-Chiocola VL. Atypical disseminated leishmaniasis similar to post-kala-azar dermal leishmaniasis in a Brazilian AIDS patient infected with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*: a case report. *Int J Infect Dis*. 2009 Nov;13(6):e504-7.
25. Bittencourt A, Silva N, Straatmann A, Nunes VL, Follador I, Badaró R. Post-kala-azar dermal leishmaniasis associated with AIDS. *Braz J Infect Dis*. 2002 Dec;6(6):313-6.
26. Trindade MA, Silva LL, Braz LM, Amato VS, Naafs B, Sotto MN. Post-kala-azar dermal leishmaniasis and leprosy: case report and literature review. *BMC Infect Dis*. 2015 Nov 23;15:543.

27. Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. *Acta Trop*. 2011 Aug;119(2-3):69-75.
28. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*. 2007 Nov;5(11):873-82.
29. Vides JP, Schwardt TF, Sobrinho LS, Marinho M, Laurenti MD, Biondo AW, et al. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol*; 2011 May 31;178(1-2):22-8.
30. Martins-Melo FR, Lima Mda S, Alencar CH, Ramos AN Jr, Heukelbach J. Epidemiological patterns of mortality due to visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection in Brazil, 2000-2011. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014 Jun;108(6):338-47.
31. Marcondes M, Rossi CN. Leishmaniose visceral no Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2013; 50(5):341-352.
32. Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*. 2015 Jul 4;9(6):588-96.
33. Maia-Elkhoury AN, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica*. 2008 Dec;24(12):2941-7.
34. Steindel M, Menin A, Stoco PH, Marlow MA, Fleith FC, Pilati C, Grisard EC. Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. *Pesq Vet Bras*. 2013;33(4):490-96.
35. Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Vigilância em Saúde. Leishmaniose visceral – casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação. Brasília: SINAN. [citado 2016 Ago 10]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/leishvbr.def>.
36. Carranza-Tamayo CO, Carvalho Mdo S, Bredt A, Bofil MI, Rodrigues RM, Silva AD, et al. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010 Jul-Aug;43(4):396-9.

37. Casanova C, Colla-Jacques FE, Hamilton JG, Brazil RP, Shaw JJ. Distribution of *Lutzomyia longipalpis* chemotype populations in São Paulo state, Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Mar 17;9(3):e0003620.
38. Ciaravollo RM, Henriques LF, Rangel O, Sampaio SM. Vigilância entomológica e controle vetorial no Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral no Estado de São Paulo: BEPA. 2015;12(135-136):24-34.
39. Rangel O, Hiramoto RM, Henriques LF, Taniguchi HH, Ciaravolo RMC, Tolezano JE, et al. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, para 2013. BEPA. 2013; 10(111): 3-14.
40. Coura-Vital W, Reis AB, Reis LE, Braga SL, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, et al. Canine visceral leishmaniasis: incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. Vet Parasitol. 2013 Nov 8;197(3-4):411-7.
41. da Costa AP, Costa FB, Soares HS, Ramirez DG, de Carvalho Araújo A, da Silva Ferreira JI, et al. Environmental Factors and Ecosystems Associated with Canine Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis. 2015 Dec;15(12):765-74.
42. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. Vet Parasitol. 2009 Oct 28;165(1-2):1-18.
43. Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. Trends Parasitol. 2012 Dec;28(12):531-8.
44. D'Andrea LA, Fonseca Eda S, Prestes-Carneiro LE, Guimarães RB, Yamashita RC, Soares CN, et al. The shadows of a ghost: a survey of canine leishmaniasis in Presidente Prudente and its spatial dispersion in the western region of São Paulo state, an emerging focus of visceral leishmaniasis in Brazil. BMC Vet Res. 2015 Oct 26;11:273.
45. Peixoto HM, de Oliveira MR, Romero GA. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. Trop Med Int Health. 2015 Mar;20(3):334-52.

46. Lara-Silva Fde O, Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, Fiuza Vde O, Pessanha JE, Regina-Silva S, et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop*. 2015 Aug;148:128-36.
47. Krawczak Fda S, Reis IA, Silveira JA, Avelar DM, Marcelino AP, Werneck GL, Labruna MB, Paz GF. *Leishmania*, *Babesia* and *Ehrlichia* in urban pet dogs: co-infection or cross-reaction in serological methods? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015 Jan-Feb;48(1):64-8.
48. Gluenz E, Ginger ML, McKean PG. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. *Curr Opin Microbiol*. 2010 Aug;13(4):473-9.
49. McCall LI, Zhang WW, Matlashewski G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. *PLoS Pathog*. 2013 Jan;9(1):e1003053.
50. Victoir K, Dujardin JC. How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. *Trends Parasitol*. 2002 Feb;18(2):81-5.
51. Mosser DM, Brittingham A. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology*. 1997;115 Suppl:S9-23.
52. Cavalcanti A, Lobo R, Cupolillo E, Bustamante F, Porrozzi R. Canine cutaneous leishmaniasis caused by neotropical *Leishmania infantum* despite of systemic disease: A case report. *Parasitol Int*. 2012 Dec;61(4):738-40.
53. Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BW, da Silva ES, et al. Factors associated with visceral leishmaniasis in the americas: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Apr 25;7(4):e2182.
54. Reiter-Owona I, Rehkaemper-Schaefer C, Arriens S, Rosenstock P, Pfarr K, Hoerauf A. Specific K39 antibody response and its persistence after treatment in patients with imported leishmaniasis. *Parasitol Res*. 2016 Feb;115(2):761-9.
55. Cota GF, de Sousa MR, Demarqui FN, Rabello A. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(5):e1665.
56. Mansueto P, Seidita A, Vitale G, Cascio A. Leishmaniasis in travelers: a literature review. *Travel Med Infect Dis*. 2014 Nov-Dec;12(6 Pt A):563-81.

57. Colombo FA, Pereira-Chiocola VL, Meira Cda S, Motoie G, Gava R, Hiramoto RM, et al. Performance of a real time PCR for leishmaniasis diagnosis using a *L. (L.) infantum* hypothetical protein as target in canine samples. *Exp Parasitol*. 2015 Oct;157:156-62.
58. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças transmissíveis. Nota Técnica conjunta nº 1/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS, 2011.
59. Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J*. 2008 Jan;175(1):45-52.
60. Mohammadiha A, Mohebbali M, Haghighi A, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, et al. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. *Exp Parasitol*. 2013 Jan;133(1):89-94.
61. Hoffmann AR, Navarro IT, Camargo Junior VE, Caldart TE, Mitsuka Breganó RM, Pereira PM. *Leishmania amazonensis* em cão com quadro clínico de leishmaniose visceral no Estado do Paraná, Brasil – relato de caso. [citado 2016 Fev 14] . Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744118038>.
62. Pires MQ, Madeira Mde F, Bittencourt VR, Pacheco Rda S. Cutaneous and visceral leishmaniasis co-infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014 Mar-Apr;47(2):243-6.
63. Ferreira MS, Borges AS. [Histoplasmosis]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009 Mar-Apr;42(2):192-8.
64. López-Vélez R, Laguna F, Alvar J, Pérez-Molina JA, Molina R, Martinez P, et al. Parasitic culture of buffy coat for diagnosis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol*. 1995 Apr;33(4):937-9.
65. Lindoso JA, Cota GF, da Cruz AM, Goto H, Maia-Elkhoury AN, Romero GA, et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Sep 18;8(9):e3136.

66. Smyth AJ, Ghosh A, Hassan MQ, Basu D, De Bruijn MH, Adhya S, et al. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*. 1992 Oct;105 (Pt 2):183-92.
67. Gualda KP, Marcussi LM, Neitzke-Abreu HC, Aristides SM, Lonardoni MV, Cardoso RF, Silveira TG. New primers for detection for detection of *Leishmania infantum* using polymerase chain reaction. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015 Sep-Oct;57(5):377-83.
68. Barreca GS, Matera G, De Majo M, Lamberti A, Liberto MC, Focà A. Early detection of *Leishmania* promastigotes in dog bone marrow cultures by acridine orange stain. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000 Aug;37(4):247-51.
69. Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res*. 2006 Mar;123(3):311-30.
70. Kaouech E, Kallel K, Toumi NH, Belhadj S, Anane S, Babba H, Chaker E. Pediatric visceral leishmaniasis diagnosis in Tunisia: comparative study between optimised PCR assays and parasitological methods. *Parasite*. 2008 Jun;15(2):143-50.
71. Sakkas H, Gartzonika C, Levidiotou S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis*. 2016 Mar;53(1):8-16.
72. de Paiva-Cavalcanti M, de Moraes RC, Pessoa-E-Silva R, Trajano-Silva LA, Gonçalves-de-Albuquerque Sda C, Tavares Dde H, et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci*. 2015 Jun 17;5:31.
73. Amato Neto V, Amato VS, Tuon FF, Gakiya E, de Marchi CR, de Souza RM, Furuch CR. False-positive results of a rapid K39-based strip test and Chagas disease. *Int J Infect Dis*. 2009 Mar;13(2):182-5.
74. Zanette MF, Lima VM, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RF, et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014 Jan-Feb;47(1):105-7.

75. Khan MG, Bhaskar KR, Kikuchi M, Salam MA, Akther T, Haque R, et al. Comparison of PCR-based diagnoses for visceral leishmaniasis in Bangladesh. *Parasitol Int*. 2014 Apr;63(2):327-31.
76. Disch J, Maciel FC, de Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003 Jul-Aug;97(4):391-5.
77. Ozerdem D, Eroglu F, Genc A, Demirkazik M, Koltas IS. Comparison of microscopic examination, rK39, and PCR for visceral leishmaniasis diagnosis in Turkey. *Parasitol Res*. 2009 Dec;106(1):197-200.
78. Fraga TL, Brustoloni YM, Lima RB, Dorval ME, Oshiro ET, Oliveira J, Oliveira AL, Pirmez C. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 May;105(3):310-3.
79. Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Magni C, et al. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2007 Jun 15;44(12):1602-10.
80. Schönián G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003 Sep;47(1):349-58.
81. Nicodemo AC, Amato VS, Tuon FF, Souza RM, Okay TS, Braz LM. Usefulness of kDNA PCR in the diagnosis of visceral leishmaniasis reactivation in co-infected patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013 Nov-Dec;55(6):429-31.
82. Lyra MR, Pimentel MI, Madeira Mde F, Antonio Lde F, Lyra JP, Fagundes A, Schubach Ade O. First report of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a urban área of Rio de Janeiro, Brazil. *Ver Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015 Sep-Oct;57(5):451-4.
83. Ferreira Tde S, Minuzzi-Souza TT, Andrade AJ, Coelho TO, Rocha Dde A, Obara MT, et al. Molecular detection of *Trypanosoma* sp. and *Blastocrithidia*

- sp. (Trypanosomatidae) in phlebotomine sand flies (Psychodidae) in the Federal District of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2015 Nov-Dec;48(6):776-9.
84. Carvalho Ferreira AL, Carregal VM, de Almeida Ferreira S, Leite RS, de Andrade AS. Detection of *Leishmania infantum* in 4 different dog samples by real-time PCR and ITS-1 nested PCR. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014 Apr;78(4):418-21.
 85. Rogers WO, Wirth DF. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jan;84(2):565-9.
 86. Yurchenko VY, Merzlyak EM, Kolesnikov AA, Martinkina LP, Vengerov YY. Structure of *Leishmania* minicircle kinetoplast DNA classes. J Clin Microbiol. 1999 May;37(5):1656-7.
 87. Pereira-Chioccola VL. Diagnóstico molecular das leishmanioses: Contribuição ao Programa de Vigilância e Controle da LVA no Estado de São Paulo. BEPA, Bol epidemiol paul . 2009;6(68): 4-13.
 88. 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.
 89. de Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. Vet Parasitol. 2006 Sep 10;140(3-4):231-8.
 90. Martins, TFC. Análise da eficiência da PCR com identificação específica do agente etiológico para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina no município de Embu das Artes.[dissertação]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina de São Paulo.2013.
 91. Satow, MM. Padronização e validação de marcadores moleculares para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar.[tese]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina de São Paulo.2016.
 92. Gomes AH, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MF, et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. Vet Parasitol. 2007 Mar 31;144(3-4):234-41.

93. HersHKovitz MA, Lewis LA. Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. *Mol Biol Evol.* 1996 Nov;13(9):1276-95.
94. Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol.* 1991 Dec;66(4):411-53.
95. Brasil. Instituto Oswaldo Cruz. Manual of Molecular Procedures. Rio de Janeiro: Training course of Molecular Epidemiology of Leishmaniasis; 2009.[citado 2016 Mar 06]. Disponível em: <http://clioc.fiocruz.br/documents/mmp.pdf>].
96. Tashakori M, Kuhls K, Al-Jawabreh A, Mauricio IL, SchöNian G, Farajnia S, et al. *Leishmania major*: genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. *Acta Trop.* 2006 Apr;98(1):52-8.
97. Parvizi P, Ready PD. Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA fragments detect three *Leishmania* species of gerbils in sandflies from Iranian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Trop Med Int Health.* 2008 Sep;13(9):1159-71.
98. Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, SchöNian G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect.* 2005 Aug-Sep;7(11-12):1224-34.
99. Roelfsema JH, Nozari N, Herremans T, Kortbeek LM, Pinelli E. Evaluation and improvement of two PCR targets in molecular typing of clinical samples of *Leishmania* patients. *Exp Parasitol.* 2011 Jan;127(1):36-41.
100. Rodrigues YKS. Isolamento e caracterização fenotípica e molecular de parasitos *Leishmania* sp de pacientes com leishmaniose tegumentar americana (LTA) atendidos no hospital Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba. [Dissertação]. João Pessoa(PB): Universidade Federal da Paraíba; 2012.
101. Toz SO, Nasereddin A, Ozbel Y, Ertabaklar H, Culha G, Sevil N, et al. Leishmaniasis in Turkey: molecular characterization of *Leishmania* from human and canine clinical samples. *Trop Med Int Health.* 2009 Nov;14(11):1401-6.
102. Mouttaki T, Morales-Yuste M, Merino-Espinosa G, Chiheb S, Fellah H, Martin-Sanchez J, et al. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and

- identification of the causative *Leishmania* species in Morocco by using three PCR-based assays. *Parasit Vectors*. 2014 Sep 4;7:420.
103. Monroy-Ostria A, Nasereddin A, Monteon VM, Guzmán-Bracho C, Jaffe CL. ITS1 PCR-RFLP diagnosis and characterization of *Leishmania* in clinical samples and strains from cases of human cutaneous leishmaniasis in states of the Mexican Southeast. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2014;2014:607287.
 104. Toz SO, Culha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Alkan MZ, Vardarli AT, et al. A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human and dog clinical samples in Turkey. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 May 9;7(5):e2205.
 105. Tolouei S, Hejazi SH, Ghaedi K, Hasheminia SJ. Identification of *Leishmania* isolates from healing and nonhealing cutaneous leishmaniasis patients using internal transcribed spacer region PCR. *Jundishapur J Microbiol*. 2014 Apr;7(4):e9529.
 106. Graça GC, Volpini AC, Romero GA, 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.
 107. Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg*. 1994 Mar;50(3):296-311.
 108. Schönián G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology*. 2011 Apr;138(4):405-25.
 109. de Almeida ME, Steurer FJ, Koru O, Herwaldt BL, Pieniazek NJ, da Silva AJ. Identification of *Leishmania* spp. by molecular amplification and DNA sequencing analysis of a fragment of rRNA internal transcribed spacer 2. *J Clin Microbiol*. 2011 Sep;49(9):3143-9.
 110. Sharma SK, Mohan A, Sharma A. Challenges in the diagnosis & treatment of military tuberculosis. *Indian J Med Res*. 2012 May;135(5):703-30.

111. Martins Dda S, Xavier MF, Masiero Fde S, Cordeiro J, Thyssen PJ. Schistosomiasis in Southern Brazil 17 years after the confirmation of the first autochthonous case. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015 May-Jun;48(3):354-7.
112. Rodríguez BL, Rojas A, Campos J, Ledon T, Valle E, Toledo W, Fando R. Differential interleukin-8 response of intestinal epithelial cell line to reactogenic and nonreactogenic candidate vaccine strains of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*. 2001 Jan;69(1):613-6.
113. da Silva MA, Pedrosa Soares CR, Medeiros RA, Medeiros Z, de Melo FL. Optimization of single-tube nested PCR for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2013 Jun;134(2):206-10.
114. Lima Junior MS, Andreotti R, Dorval ME, Oshiro ET, Oliveira AG, Matos Mde F. [Identification of *Leishmania* species isolated in human cases in Mato Grosso do Sul, by means of the polymerase chain reaction]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009 May-Jun;42(3):303-8.
115. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975 May 25;94(3):441-8.
116. Salam MA, Khan MG, Bhaskar KR, Afrad MH, Huda MM, Mondal D. Peripheral blood buffy coat smear: a promising tool for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2012 Mar;50(3):837-40.
117. Maia Z, Lírio M, Mistro S, Mendes CM, Mehta SR, Badaro R. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 Jan;6(1):e1484.
118. Romero HD, Silva Lde A, Silva-Vergara ML, Rodrigues V, Costa RT, Guimarães SF, et al. Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 Jul;81(1):27-33.
119. Moura AS, Lopes HM, Mourão MV, Morais MH. Performance of a rapid diagnostic test for the detection of visceral leishmaniasis in a large urban setting. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013 Sep-Oct;46(5):589-93.

120. Cunningham J, Hasker E, Das P, El Safi S, Goto H, Mondal D, et al; WHO/TDR Visceral Leishmaniasis Laboratory Network. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2012 Nov 15;55(10):1312-9.
121. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Sep;9(5):951-8.
122. Singh DP, Sundar S, Mohapatra TM. The rK39 strip test is non-predictor of clinical status for kala-azar. *BMC Res Notes*. 2009 Sep 22;2:187.
123. Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2002 Jan;40(1):210-5.
124. Wanderley, LB. Avaliação da especificidade dos primers RV1 e RV2 para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral. [dissertação]. Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz;2011.
125. Odiwuor SO, Saad AA, De Doncker S, Maes I, Laurent T, El Safi S, et al. Universal PCR assays for the differential detection of all Old World *Leishmania* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Feb;30(2):209-18.
126. Mahdy MA, Al-Mekhlafi AM, Abdul-Ghani R, Saif-Ali R, Al-Mekhlafi HM, Al-Eryani SM, et al. First molecular characterization of *Leishmania* species causing visceral leishmaniasis among children in Yemen. *PLoS One*. 2016 Mar 11;11(3):e0151265.
127. Medeiros, Rafael Accioli. Caracterização da *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães provenientes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco. [dissertação]. Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biologia Aplicada à Saúde. 2013.
128. Luna EJA, Silva-Júnior JB. Doenças transmissíveis, endemias, epidemias e pandemias. Fundação Oswaldo Cruz. A saúde no Brasil em 2030 - prospecção estratégica do sistema de saúde brasileiro: população e perfil sanitário [online]. Rio de Janeiro: Fiocruz/Ipea/Ministério da Saúde/Secretaria de Assuntos Estratégicos da Presidência da República, 2013; 2:123-176

129. Zampieri R. Análise comparativa de métodos moleculares de detecção e identificação de *Leishmania* spp. e desenvolvimento de metodologia para o diagnóstico de leishmanioses.[dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2013.
130. Leite RS, Ferreira Sde A, Ituassu LT, de Melo MN, de Andrade AS. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. Vet Parasitol. 2010 Jun 24;170(3-4):201-6.
131. Fallah E , Khanmohammadi M, Rahbari S, Farshchian M, Farajnia S, Hamzavi F, et al. Serological survey and comparison of two polymerase chain reaction (PCR) assays with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs. Afr J Biotechnol. 2011;10(4):648-56.
132. Oliveira EMM, Oliveira TC, Souza AM, Santos TF, Lima IS. Desenho de primers degenerados através da bioinformática. Comunicado técnico 208. Embrapa. Rio de Janeiro. 2015;1-4.
133. Martinez E, Mollinedo S, Torrez M, Muñoz M, Bañuls AL, Le Pont F. Co-infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum*/*L. chagasi* in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002 Sep-Oct;96(5):529-32.
134. Quaresma PF, Murta SM, Ferreira Ede C, da Rocha-Lima AC, Xavier AA, Gontijo CM. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. Acta Trop. 2009 Sep;111(3):289-94.
135. Regina-Silva S, Fortes-Dias CL, Michalsky ÉM, França-Silva JC, Quaresma PF, da Rocha Lima AC, et al. Evaluation of parasitological examination, kDNA polymerase chain reaction and rK39-based immunochromatography for the diagnosis of visceral leishmaniasis in seropositive dogs from the screening-culling program in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2014 Jul;47(4):462-8.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: DEFINIÇÃO DE UM ALGORITMO PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Pesquisador Responsável: LUCIA MARIA ALMEIDA BRAZ

Versão: 1

Pesquisador Executante: NATALIA SOUZA DE GODOY

CAAE: 07859712.0.0000.0068

Co-autores: THELMA SUELY OKAY

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: MEDICINA TROPICAL

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9846

Número do Parecer: 191.806

Data da Relatoria: 31/01/13 *ad-referendum*

Apresentação do Projeto: Adequada

Objetivo da Pesquisa: DEFINIR DE UM ALGORITMO PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE VISCERAL, com os dados resultantes de projeto Fapesp já aprovado anteriormente, por meio da validação da técnica de PCR mediante a utilização de outros alvos moleculares espécie-específicos da região do espaçador interno transcrito do DNA ribossomal 1 (ITS1) associada à técnica de restrição enzimática (RFLP) para a definição do gênero *Leishmania* e da espécie *infantum*, nas amostras dos pacientes já investigados quanto ao kDNA e assim definir um algoritmo de processamento das amostras sanguíneas

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há riscos, nem benefícios diretos ao paciente, no entanto, a agilização do diagnóstico molecular específico da leishmaniose visceral a partir de amostra sanguínea, bem como a minimização de procedimentos invasivos e dolorosos para o paciente durante o diagnóstico anteriormente realizado a partir de punção de medula óssea, pode ser um benefício futuro para outros pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto tem valor científico relevante e justificado. Pois almeja a obtenção de um exame que possibilitará o diagnóstico da leishmaniose visceral ao nível de espécie, direcionando a moléstia para um tratamento rápido e adequado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Considerando que o projeto utilizará amostras e dados já obtidos anteriormente por outro projeto FAPESP com os devidos termos de consentimento aprovados, apenas para validar os experimentos e obter um valor referência para diagnóstico, não há necessidade de elaborar outro termo de consentimento

Recomendações: Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: O projeto foi considerado adequado e portanto aprovado.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP a interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 05 de Fevereiro de 2013

ANEXO 1 - RESOLUÇÃO DO CEP

RESOLUÇÃO Nº 001/2013

RESOLUÇÃO Nº 001/2013

RESOLUÇÃO Nº 001/2013

RESOLUÇÃO Nº 001/2013

RESOLUÇÃO Nº 001/2013

RESOLUÇÃO Nº 001/2013

RESOLUÇÃO Nº 001/2013

RESOLUÇÃO Nº 001/2013

RESOLUÇÃO Nº 001/2013

RESOLUÇÃO Nº 001/2013

ANEXO 2 - RESOLUÇÃO DO CEP

**ANEXO B- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E
ESCLARECIDO DO PROJETO FAPESP : 2010-50304-8**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../..... Nº: APTO:

ENDEREÇO: CIDADE:

BAIRRO: CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../..... Nº: APTO:

ENDEREÇO: CIDADE:

BAIRRO: CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA "DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL: PESQUISA DO
PARASITA NO SANGUE PERIFÉRICO POR CONCENTRAÇÃO E ASSOCIAÇÃO ÀS TÉCNICAS
CLÁSSICAS E MÉTODO MOLECULAR (kDNA)"**

2. PESQUISADOR: DRA. LÚCIA MARIA ALMEIDA BRAZ

CARGO/FUNÇÃO: **BIOLOGISTA** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **14076-01**

UNIDADE DO HCFMUSP: **INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Desenho do estudo e objetivo: A leishmaniose visceral é uma doença que atinge o fígado, o baço e a medula óssea fazendo com que eles aumentem de tamanho, provocando desconforto, infecções e febre. Para fazer o diagnóstico é preciso examinar o material da medula óssea, obtido a partir da perfuração do osso peitoral, ou do tórax, chamado de esterno, e também é preciso examinar o sangue. Mas alguns resultados diagnósticos melhores são obtidos com as técnicas que examinam o material da medula óssea. Então, vamos modificar algumas técnicas e comparar o exame do sangue com o exame do material da medula. Assim, poderemos descobrir qual delas é realmente a melhor para o diagnóstico da doença. Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem como objetivo melhorar o diagnóstico da leishmaniose visceral.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: Para verificar se o parasita, chamado de leishmania, está presente no material da medula óssea ou do sangue, vamos olhar no microscópio. Também vamos colocar o material em um tubo de cultura para ver se o parasita cresce, e também vamos fazer um teste de DNA do parasita chamado PCR. Estas técnicas serão realizadas com o material colhido de sua medula óssea, que será um volume aproximadamente de 1 mililitro, e com o seu sangue colhido, que será um volume aproximadamente de 7 mililitros. Para obtenção do sangue, vamos colher o sangue da veia do antebraço. Para obtenção do material da medula óssea vamos perfurar, sob anestesia, com seringa o osso do peito chamado de esterno.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: Para verificar se o parasita, chamado de leishmania, está presente no material da medula óssea ou do sangue, costuma-se olhar o material no microscópio. Também costuma-se colocar o material em um tubo de cultura para ver se o parasita cresce. Estas técnicas costumam ser realizadas com o material colhido de medula óssea, que costuma ser de um volume de 1 mililitro, e com o sangue colhido, que costuma ser de um volume de aproximadamente 5 mililitros. Para obtenção do sangue, costuma-se colher o sangue da veia do antebraço. Para obtenção do material da medula óssea costuma-se perfurar, sob anestesia, com seringa o osso do peito chamado de esterno.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: Picada no braço, costumeira, para colher o sangue. Punção do osso esterno, com anestesia local, dolorida, para colher material de medula óssea.

5 – **Benefícios para o participante** : Somente no final do estudo poderemos concluir qual dos dois procedimentos é melhor, o exame do sangue ou o exame do material da medula óssea.

6 – **Garantia de acesso**: Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra Lúcia Maria Almeida Braz, que pode ser encontrada no endereço: Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, nº470/500-1º andar, sala 16, telefone 30617041-42. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

7 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

8 – **Direito de confidencialidade** – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

9 – **Direito de ser mantido atualizado**: Sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

10 – **Despesas e compensações**: Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

11 – **Compromisso do pesquisador**: Utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL: PESQUISA DO PARASITA NO SANGUE PERIFÉRICO POR CONCENTRAÇÃO E ASSOCIAÇÃO ÀS TÉCNICAS CLÁSSICAS E MÉTODO MOLECULAR (kDNA)".

Eu discuti com o Dr. Valdir Sabbaga Amato ou Dr. José Ângelo Lauletta Lindoso, sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Dra. Lúcia Maria Almeida Braz
Bióloga
CRB - 14076-01

ANEXO C – ARTIGO PUBLICADO NO *JOURNAL OF PARASITOLOGY RESEARCH*.

Hindawi Publishing Corporation
Journal of Parasitology Research
Volume 2016, Article ID 1084353, 7 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/1084353>

Research Article

Could kDNA-PCR in Peripheral Blood Replace the Examination of Bone Marrow for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis?

Natalia Souza de Godoy,¹ Marcos Luiz Alves Andrino,¹
Regina Maia de Souza,¹ Erika Gakiya,¹ Valdir Sabbaga Amato,^{1,2}
José Ângelo Lauletta Lindoso,^{3,4} and Lucia Maria Almeida Braz⁵

¹Laboratório de Investigação Médica, Parasitologia LIM 46 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), Avenida Dr. Enéas Carvalho de Aguiar 470/500, 05403-000 São Paulo, SP, Brazil

²Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, HCFMUSP, Avenida Dr. Enéas Carvalho de Aguiar 255, 05403-000 São Paulo, SP, Brazil

³Laboratório de Seroepidemiologia e Imunobiologia, IMTSP-USP, Avenida Dr. Enéas Carvalho de Aguiar 470/500, 05403-000 São Paulo, SP, Brazil

⁴Hospital Emílio Ribas, Avenida Dr. Arnaldo 165, 01246-900 São Paulo, SP, Brazil

⁵Laboratório de Parasitologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo (IMTSP-USP), Avenida Dr. Enéas Carvalho de Aguiar 470/500, 05403-000 São Paulo, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Lucia Maria Almeida Braz; lmabraz@usp.br

Received 1 April 2016; Revised 29 June 2016; Accepted 10 July 2016

Academic Editor: José F. Silveira

Copyright © 2016 Natalia Souza de Godoy et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The aim of this study was to evaluate whether the molecular (kDNA-PCR) and parasitological diagnosis in peripheral blood (PB) could replace the invasive and painful bone marrow collection (BM) in the diagnosis of visceral leishmaniasis (VL). PB from suspected VL patients was evaluated by parasitological and molecular techniques using as the gold standard (GS) a combination of clinical, epidemiological, and immunochromatographic test (PB-rK39) results and parasitological examination of BM. Based on the GS, 38 samples from 32 patients were grouped: Group 1, 20 samples of VL cases, and Group 2, 18 samples of non-VL cases. In order to evaluate the parasitological and molecular techniques in PB, the samples were examined. From Group 1, PB kDNA-PCR was positive in 20 samples and in 19 of 20 in BM kDNA-PCR examination. However, the parasitological examination of buffy coat was insensitive, being able to detect only 4 cases from Group 1. All samples from Group 2 were negative. We concluded that, for the diagnosis of visceral leishmaniasis, the parasitological examination of peripheral blood was not useful; however, molecular diagnosis by kDNA-PCR, performed in peripheral blood, could be useful to replace the parasitological examination of bone marrow.

1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) has been reported in 88 countries, and 90% of the world's burden is localized in India, Brazil, and Sudan [1]. In the Americas, VL is known as American Visceral Leishmaniasis (AVL) and its etiologic agent is *Leishmania (Leishmania) infantum* (*L. (L.) chagasi*, syn.) [2]. VL is characterized by its chronicity and systemic dissemination capacity [3] and it can be fatal if treatment is not administered. To be correctly diagnosed, VL requires the use of highly sensitive and specific laboratory methods [4, 5]. In the context of VL, the techniques that are considered

gold standards (GS) are the direct microscopic examination of bone marrow (BM) or spleen aspirate samples, with observation of amastigotes on smears (BM-S), and the isolation of promastigotes in culture (BM-C) [6, 7]. More recently, the rK39 immunochromatographic test has been included [8]. Although splenic aspirate smears show the highest sensitivity, followed by BM aspirate smears, both exams require invasive and more risky procedures [9–11]. Given the fact that a considerable number of VL patients are children and immunocompromised patients, it would be desirable to adopt less risky and painful procedures provided that similar sensitivity and specificity rates are obtained. Therefore, the