

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Rafaela Lira Nogueira de Luna

**PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR DUPLEX PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E ESPOROTRICOSE**

RECIFE

2020

RAFAELA LIRA NOGUEIRA DE LUNA

**PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR DUPLEX PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E ESPOROTRICOSE**

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Biociências do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Filipe Dantas Torres

Coorientadora: Dra. Luciana Aguiar Figueredo

RECIFE

2020

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

- L961p Luna, Rafaela Lira Nogueira.
Padronização de uma PCR duplex para diagnóstico diferencial da leishmaniose tegumentar e esporotricose / Rafaela Lira Nogueira Luna. - Recife: [s.n.], 2020.
53 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.
Orientador: Filipe Dantas Torres; coorientadora: Luciana Aguiar Figueredo.
1. Diagnóstico diferencial. 2. Sporothrix. 3. Leishmania. I. Torres, Filipe Dantas Torres. II. Figueredo, Luciana Aguiar. III. Título.

CDU 578

RAFAELA LIRA NOGUEIRA DE LUNA

**PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR DUPLEX PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E ESPOROTRICOSE**

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Biociências do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Zulma Maria de Medeiros

Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Juliana Figueirêdo da Costa Lima Suassuna Monteiro

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Filipe Dantas Torres

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por minha saúde, família, amigos e por estar concluindo mais uma etapa importante na minha vida. Em suma, por tudo.

Aos meus pais, pelo incentivo aos estudos, por todo o carinho, conselhos, proteção e doçura.

Aos meus irmãos, por todo o amor, paciência e companheirismo. Serei eternamente grata a vocês por sempre estarem comigo. Todas as dificuldades que passamos fortaleceram nossa fraternidade.

A Melzinha, por toda a delicadeza de amar, pelos sorrisos arrancados, fidelidade e companheirismo. Minha vida tornou-se melhor com você ao meu lado.

A minha tia Rosicleide e ao meu tio Elias, por todo o carinho e apoio.

A Talita Leite Veloso, por todos os conselhos, companheirismo e generosidade.

Aos amigos que conquistei ao longo destes anos. Vocês são fundamentais na minha vida. Os momentos difíceis tornam-se mais leves com vocês ao meu lado.

As irmãs Salesianas, por contribuírem com a minha formação profissional e pessoal.

Ao meu orientador Dr. Filipe Dantas-Torres, pelos ensinamentos, paciência e humildade. Por todo auxílio e disposição.

A minha co-orientadora, Dra. Luciana Aguiar Figueredo, por toda compreensão, delicadeza e simplicidade. Além da enriquecedora experiência científica, com a senhora apreendi a confiar no meu trabalho.

A Kamila Gaudêncio da Silva Sales, por sempre está disposta a me escutar, entender e aconselhar. Pelo carinho, gentileza, e, principalmente, humanidade. À Karina Baracho, pelo companheirismo. Por todo o conhecimento e felicidade.

A equipe do Laboratório de Imunoparasitologia, Débora Miranda, Joanna Lúcia e Lucas Cristhian pela amizade, afeto e aprendizado.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde, pelo incentivo e contribuição para a minha formação profissional.

Ao Instituto Aggeu Magalhães, por toda infraestrutura disponibilizada para a realização do projeto.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta e indiretamente durante o período do mestrado.

LUNA, Rafaela Lira Nogueira. **Padronização de uma PCR duplex para diagnóstico diferencial da leishmaniose tegumentar e esporotricose.** 2020. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar (LT) e a esporotricose são doenças cutâneas com características clínicas semelhantes. A reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do complexo *Sporothrix schenckii* e *Leishmania* spp. vem sendo integrada a rotina de laboratórios da rede pública e privada, aumentando a rapidez, precisão e sensibilidade diagnóstica. Nesse contexto, pretendeu-se nesse estudo desenvolver um protocolo de PCR duplex para detecção de *Sporothrix schenckii sensu stricto* (s.s.) e *Leishmania braziliensis*. Inicialmente, foi realizada uma PCR uniplex, onde os *primers* (S2/R2 e B1/B2) foram testados individualmente com os seus respectivos alvos, e, em seguida, um primeiro sistema duplex foi testado. Para otimização da PCR duplex, realizaram-se ajustes nas concentrações do MgCl₂, da Taq DNA polimerase e de cada par de *primers*, bem como, na temperatura de anelamento, até que os ensaios resultassem em um protocolo onde os alvos fossem amplificados simultaneamente e com sensibilidade analítica equivalente. Os resultados obtidos com os protocolos no formato uniplex demonstraram uma sensibilidade analítica de 0,5 pg de DNA para *L. braziliensis* e de 5 pg de DNA para *S. schenckii s.s.* Enquanto que, os ensaios de PCR duplex apresentaram detecção até o ponto com 0,5 pg de DNA de ambos os patógenos. Os protocolos padronizados não demonstraram ampliações inespecíficas ou cruzadas com o DNA dos outros organismos testados. Diante disso, concluí-se que a PCR duplex padronizada no presente estudo permite a detecção e diferenciação de *L. braziliensis* e *S. schenckii s.s.* com alta sensibilidade e especificidade. Como também, poderá, após validação, adequar-se a rotina de laboratórios clínicos, centros de pesquisa e universidades, contribuindo para o diagnóstico diferencial da LT e esporotricose e auxiliando na escolha da abordagem terapêutica mais conveniente ao caso.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular. *Sporothrix schenckii*. *Leishmania* spp.

LUNA, Rafaela Lira Nogueira. **Standardization of a duplex PCR for differential diagnosis of Cutaneous leishmaniasis and sporotrichosis.** 2020. Dissertation (Academic Master's in Bioscience and Biotechnology at Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2020.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) and sporotrichosis are cutaneous diseases with similar clinical characteristics. The polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Sporothrix schenckii* and *Leishmania* spp. has been integrated in the routine of public and private laboratories, increasing the speed, precision and diagnostic sensitivity. In this context, it was intended in this study to develop a duplex PCR protocol for the detection of *Sporothrix schenckii sensu stricto* (*s.s.*) and *Leishmania braziliensis*. Initially, a uniplex PCR was performed, where the primers (S2/R2 and B1/B2) were tested individually with their respective targets, and then a first duplex system was tested. To optimize the duplex PCR, adjustments were made in the concentrations of MgCl₂, Taq DNA polymerase and each pair of primers, as well as in the annealing temperature, until the tests resulted in a protocol where the targets were amplified simultaneously and with analytical sensitivity equivalent. The results obtained with the protocols in the uniplex format demonstrated an analytical sensitivity of 0.5 pg of DNA for *L. braziliensis* and 5 pg of DNA for *S. schenckii s.s.* Whereas, the duplex PCR assays showed detection up to the point with 0.5 pg of DNA from both pathogens. Therefore, it is concluded that the duplex PCR standardized in the present study allows the detection and differentiation of *L. braziliensis* and *S. schenckii s.s.* with high sensitivity and specificity. After validation, it may be suitable for use in clinical laboratories, research centers and universities routine, contributing to the differential diagnosis of LT and sporotrichosis and helping to choose the most appropriate therapeutic approach to the case.

Keywords: Molecular diagnosis. *Sporothrix schenckii*. *Leishmania* spp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ciclo de transmissão na esporotricose humana e animal	11
Figura 2 -	Análise filogenética correlacionada com o comportamento ecológico das espécies de <i>Sporothrix</i>	12
Figura 3 -	Distribuição e carga relativa da esporotricose em todo o mundo	13
Figura 4 -	Cultura de <i>S. schenckii</i> em meio Ágar Sabouraud Dextrose na fase filamentosa. Na microscopia apresenta hifas finas e conídios dispostos em forma de margarida	14
Figura 5 -	Exame direto de amostras clínicas para o diagnóstico de esporotricose	15
Figura 6 -	Corpo de asteroide de <i>Sporothrix</i> rodeado por numerosos neutrófilos	16
Figura 7 -	Diferentes apresentações clínicas da esporotricose humana	18
Figura 8 -	Comparação entre as lesões de pacientes com esporotricose e LT	20
Figura 9 -	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	21
Figura 10 -	Status de endemicidade da LT em todo o mundo, 2018	22
Figura 11 -	Microscopia óptica de <i>Leishmania</i> sp.	23
Quadro 1 -	Padronização das condições de reação e ciclagem da PCR uniplex e duplex	34
Figura 12 -	Reprodutibilidade e sensibilidade analítica da PCR uniplex para <i>S. schenckii</i> s.s.	35
Figura 13 -	Reprodutibilidade e sensibilidade analítica da PCR uniplex para <i>L. braziliensis</i>	35
Figura 14 -	Reprodutibilidade e sensibilidade analítica da PCR duplex para <i>S. schenckii</i> s.s.	36
Figura 15 -	Reprodutibilidade e sensibilidade analítica da PCR duplex para <i>L. braziliensis</i>	36
Figura 16 -	Reprodutibilidade e detecção simultânea de <i>S. schenckii</i> s.s. e <i>L. braziliensis</i> na PCR duplex	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
<i>CHS1</i>	Quitina sintase 1
CL	Cutaneous leishmaniasis
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
kDNA	DNA do cinetoplasto
LT	Leishmaniose tegumentar
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ml	Mililitro
mm	Milímetro
ng	Nanograma
NTC	<i>No template control</i>
Pb	Pares de bases
pg	Picograma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PM	Peso molecular
pmol	Picomol
μl	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 Esporotricose	11
2.1.1 <i>Diagnóstico laboratorial</i>	14
2.1.2 <i>Formas clínicas e diagnóstico diferencial</i>	17
2.2 Leishmaniose tegumentar	20
2.2.1 <i>Diagnóstico</i>	23
3 JUSTIFICATIVA	26
4 PERGUNTA CONDUTORA	27
5 HIPÓTESE	28
6 OBJETIVOS	29
6.1 Objetivo geral	29
6.2 Objetivos específicos	29
7 METODOLOGIA	30
7.1 Aspectos éticos	30
7.2 Cepas de referência	30
7.3 Extração de DNA	30
7.4 <i>Primers</i>	31
7.5 Ensaio de PCR uniplex e duplex	31
7.6 Sensibilidade e especificidade analítica	32
8 RESULTADOS	33
8.1 Padronização da PCR uniplex e duplex	33
8.2 Sensibilidade analítica	34
8.3 Reprodutibilidade	37
8.4 Especificidade analítica	37
9 DISCUSSÃO	38
10 CONCLUSÕES	41
11 PERSPECTIVAS	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	52
ANEXO B - CARTA RESPOSTA DA CEUA	53

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma doença cutânea causada por espécies de fungos termodimórficos pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*, as quais são amplamente distribuídas no mundo, sendo mais prevalentes em áreas temperadas e tropicais (CHAKRABARTI *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2007). No Brasil, nas últimas duas décadas, ocorreu uma grande expansão dos casos de esporotricose (GREMIÃO *et al.*, 2017; OROFINO-COSTA *et al.*, 2017), porém ainda existe uma carência de registros de casos em várias regiões do país, principalmente nos municípios da Região Nordeste (FILGUEIRA, 2009).

O diagnóstico da esporotricose geralmente é feito com base nos achados clínicos (*e.g.*, nódulos ulcerados, lesões verrucosas) (BONIFAZ; TIRADO-SÁNCHEZ, 2017; CLEBAK; MALONE, 2018). Entretanto, devido à diversidade de apresentações clínicas, a esporotricose demonstra semelhanças com outras doenças infecciosas e não infecciosas, tanto tegumentares quanto sistêmicas (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). Essas similaridades podem dificultar o diagnóstico clínico quando os agentes etiológicos não são identificados. Entre os possíveis diagnósticos diferenciais da esporotricose, a leishmaniose tegumentar (LT) é de particular interesse, devido à sobreposição de aspectos clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e histopatológicos existentes entre essas doenças (LIMA BARROS *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2007).

Os tratamentos da LT e esporotricose são distintos, tornando-se essencial a utilização de metodologias que garantam um diagnóstico específico (LIMA BARROS *et al.*, 2005). Os métodos de diagnóstico para ambas as doenças geralmente incluem exame direto, cultura e/ou exame histopatológico (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006; PEARSON; SOUSA, 1996). Porém, essas metodologias possuem algumas desvantagens, como baixa sensibilidade (*e.g.*, exame direto), longo tempo para o resultado (*e.g.*, cultura), além de serem influenciadas pelo estado imunológico do paciente, no caso da sorologia (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006; PEARSON; SOUSA, 1996). Apesar disso, o isolamento em cultura e a identificação do agente causador ainda são os métodos de diagnóstico padrão-ouro para comprovação da LT e esporotricose (VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; MAHAJAN, 2014).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido cada vez mais utilizada no diagnóstico de infecções fúngicas e parasitárias (HU *et al.*, 2003; REITHINGER; DUJARDIN, 2007), demonstrando ser uma ótima ferramenta para a identificação de espécies

de *Leishmania* spp. e do complexo *S. schenckii* em amostras clínicas (CASTILHO; SHAW; FLOETER-WINTER, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Além disso, variações da PCR têm permitido a diferenciação e identificação simultânea de espécies de microrganismos em um único ensaio (*e.g.*, PCR duplex), reduzindo tempo e custos associados ao processo. Nesse contexto, uma PCR duplex capaz de diagnosticar simultaneamente *Leishmania* spp. e o complexo *S. schenckii* será uma ferramenta promissora para o estudo e diagnóstico diferencial da LT e esporotricose, principalmente em áreas onde ambas as doenças são endêmicas, possibilitando um tratamento específico mediante a confirmação da infecção.

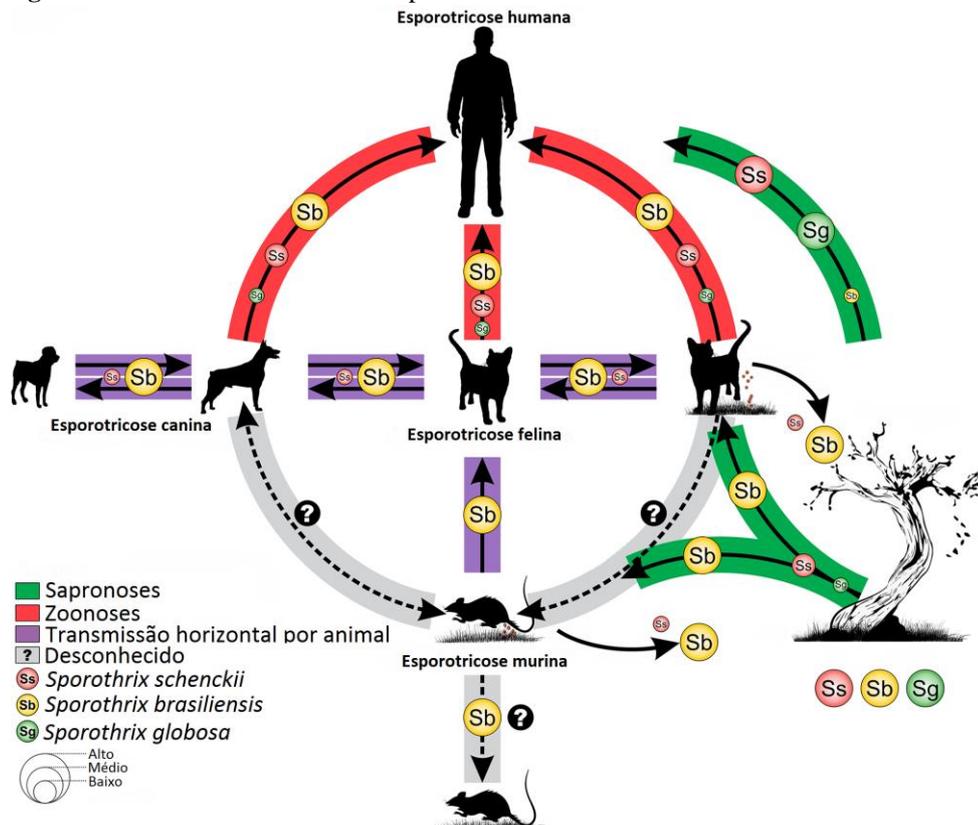
2 REVISÃO DA LITERATURA

A seguir é descrita a revisão da literatura do presente trabalho de dissertação de mestrado.

2.1 Esporotricose

A infecção por fungos do complexo *S. schenckii* está associada as vias de transmissão sapronótica e zoonótica (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). Durante muito tempo, a esporotricose ficou conhecida como a "micose da roseira" ou "micose do jardineiro", visto que a via clássica de infecção resultava da inoculação do agente etiológico na pele ou mucosa do hospedeiro, por trauma com material vegetal contaminado (CLEBAK; MALONE, 2018). No entanto, atualmente, tornaram-se mais frequentes os casos atribuídos à transmissão horizontal de animais (gato-gato ou gato-cão) e transmissão zoonótica, onde casos humanos estão principalmente associados a arranhões ou mordidas de animais infectados (GREMIÃO *et al.*, 2017) (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo de transmissão na esporotricose humana e animal



Fonte: Adaptado de Rodrigues, Hoog e Camargo (2016).

A esporotricose possui ampla distribuição global, com casos relatados na África, Austrália, Ásia, Europa e nas Américas (CHAKRABARTI *et al.*, 2015). Por outro lado, em alguns países como África do Sul, Brasil e China é encontrada uma maior prevalência da doença, sendo-lhes atribuído o status de áreas hiperendêmicas (ZHANG *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2014). No Brasil, os principais surtos de esporotricose foram notificados no estado do Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo. Além disso, casos humanos e animais também tem sido relatados em outros estados do país (GUTIERREZ-GALHARDO *et al.*, 2015). Em particular, no Rio de Janeiro, durante o período de 1997 a 2011, foram registrados 4.188 casos humanos e 4.703 casos de esporotricose felina foram registrados até 2015 (GREMIÃO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2012).

Figura 3 - Distribuição e carga relativa da esporotricose em todo o mundo.



Fonte: Adaptado de Chakrabarti *et al.* (2015).

A notificação dos casos de esporotricose é obrigatória no estado do Rio de Janeiro, mas não nos demais estados brasileiros. Logo, dados de prevalência e incidência, nos outros estados, são obtidos apenas com base nos casos relatados na literatura, certamente subestimando a real importância epidemiológica da doença, principalmente em relação aos surtos e epidemias (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). No nordeste do Brasil, apesar da escassez de informações, há relatos esporádicos da doença nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas e Pernambuco (ARAÚJO; LEAL, 2016; FILGUEIRA, 2009; MARQUES-MELO *et al.*, 2014; NUNES *et al.*, 2011). Silva *et al.* (2018), em um estudo realizado na região metropolitana do Recife, identificaram que dos 115 casos suspeitos, foram

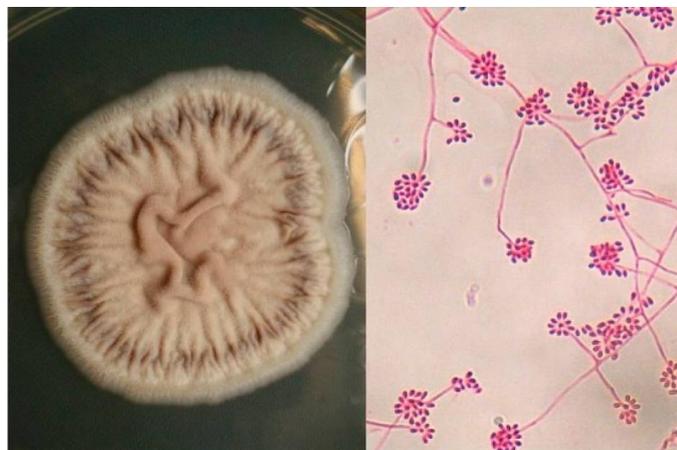
confirmados 59 casos de esporotricose felina, número nunca registrado anteriormente no estado de Pernambuco.

2.1.1 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da esporotricose é realizado através da correlação de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). Os métodos laboratoriais incluem técnicas convencionais (*e.g.*, cultura, exame direto e histopatológico), como também, metodologias mais sofisticadas, tal como, o diagnóstico molecular (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017).

O isolamento em cultura e identificação de espécies do complexo *S. schenckii* é considerado o método padrão-ouro para o diagnóstico definitivo da doença (MAHAJAN, 2014). O fungo é isolado em meio ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol ou cicloheximida e incubado a 25-28°C, durante 5-8 dias. Inicialmente, são observadas colônias hialinas e filamentosas, as quais desenvolvem tardiamente uma coloração acastanhada a enegrecida (MORRIS-JONES, 2002) (Figura 4). A partir da microscopia, são visualizadas hifas septadas e ramificadas com conidióforos, cujas extremidades apresentam conídios arranjados em forma de margarida (SUN *et al.*, 2018). A identificação fenotípica do patógeno é completada após a conversão da fase micelial em leveduriforme, a qual é realizada através do cultivo em meios como ágar chocolate, ágar infusão cérebro e coração ou ágar sangue a 35-37°C (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011).

Figura 4 - Cultura de *S. schenckii* em meio Ágar Sabouraud Dextrose na fase filamentosa. Na microscopia apresenta hifas finas e microconídios dispostos em forma de margarida.



Fonte: Bonifaz e Tirado-Sánchez (2017).

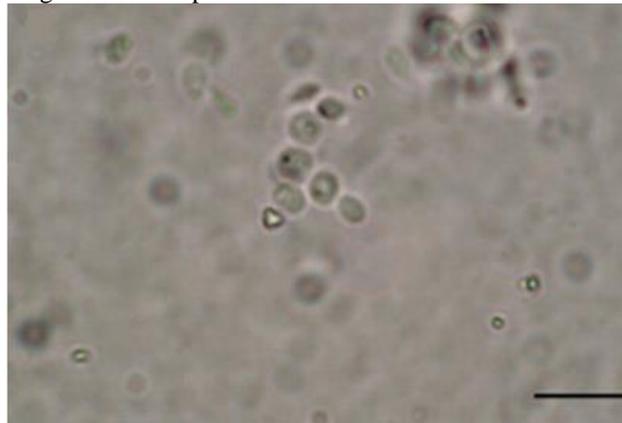
Legenda: (A) Cultura de *S. schenckii* na fase filamentosa (Ágar Sabouraud Dextrose, 28°C); (B) estado filamentoso de *S.*

schenckii com hifas finas e microconídios denticulares (Eritrosina, 40×).

O exame direto das espécies do complexo *S. schenckii* pode ser realizado a partir de amostras obtidas de lesões cutâneas (pus e exsudatos), expectoração ou líquido sinovial (ARENAS *et al.*, 2018). O hidróxido de potássio em uma diluição de 10% a 40% pode ser usado para visualização das células leveduriformes, as quais são globosas ou em forma de charuto (alongadas e fusiformes) com 2-6 µm de diâmetro (NEGRINI *et al.*, 2013) (Figura 5). O exame direto também pode ser demonstrado a partir da coloração de Gram e com outros corantes específicos (GEZUELE; ROSA, 2005; LACAZ *et al.*, 2002).

Em humanos e alguns animais (*e.g.*, cães), a detecção do patógeno através do exame direto é dificultada, pois as células leveduriformes são pequenas e apresentam-se em baixas quantidades em suas lesões (MIRANDA *et al.*, 2009). Por outro lado, em gatos infectados, as estruturas fúngicas são facilmente visualizadas por essa técnica, devido à sua presença em maiores quantidades (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). Contudo, o exame direto com visualização de estruturas fúngicas serve apenas como um indicativo da infecção por esse patógeno (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017), uma vez que as células de *S. schenckii* em tecido podem ser confundidas com estruturas de *Histoplasma capsulatum* ou *Candida glabrata* (LARONE, 2002).

Figura 5 - Exame direto de amostras clínicas para o diagnóstico de esporotricose



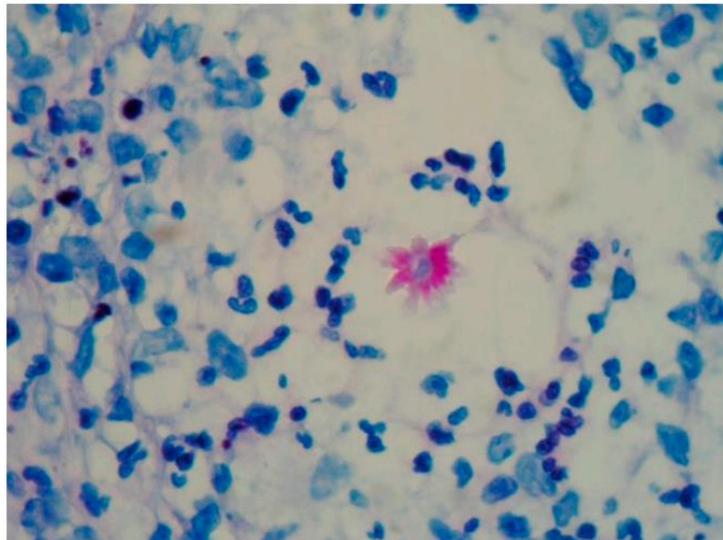
Fonte: Barros, Paes e Schubach (2011).

Legenda: Exame direto (KOH 10%) de lesão de paciente humano com esporotricose, evidenciando células de levedura de brotamento inespecíficas. Barras, 10 µm.

Espécies de *S. schenckii* geralmente são visualizadas em tecidos através de coloração com hematoxilina e eosina, embora outras colorações especiais possam ser utilizadas, tais como, metenamina de prata de Grocott-Gomori ou ácido periódico de Schiff, as quais podem

melhorar a detecção do fungo (LARONE, 2002; MORRIS-JONES, 2002). A avaliação da reação tecidual dos pacientes com esporotricose também deve ser realizada nos exames histopatológicos (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). Geralmente, a lesão consiste em uma dermatite granulomatosa crônica difusa, muitas vezes com abscesso central, sendo possível observar nos cortes histológicos hiperqueratose, acantose, microabscessos intraepidérmicos e granulomas mistos com corpos asteroides (MORRIS-JONES, 2002; OROFINO-COSTA *et al.*, 2017) (Figura 6). A presença dos corpos asteroides é observada em 40% dos casos positivos para o complexo *S. schenckii*, cuja estrutura consiste de uma célula leveduriforme envolvida por uma bainha eosinofílica com espículas irradiantes (RODRÍGUEZ; SARMIENTO, 1998).

Figura 6 - Corpo de asteroide de *Sporothrix* rodeado por numerosos neutrófilos



Fonte: Arenas (2018).

Várias metodologias foram descritas para o estabelecimento do diagnóstico imunológico da esporotricose através da detecção de anticorpos em amostras de pacientes infectados, porém não são empregados rotineiramente (RUDRAMURTHY; CHAKRABARTI, 2017). Os testes baseados em imunodifusão e aglutinação em látex foram os primeiros aplicados para o sorodiagnóstico da doença (BLUMER *et al.*, 1973; ALBORNOZ; VILLANUEVA; TORRES, 1984), porém possuem baixa sensibilidade nos casos de esporotricose cutânea, como também, não identificam o isotipo de imunoglobulina envolvido na resposta (ALBORNOZ; VILLANUEVA; TORRES, 1984). Com a aplicação do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), houve uma melhora na sensibilidade e especificidade diagnóstica para 97% e 89%, respectivamente (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2007).

Contudo, de modo geral, os resultados dos métodos sorológicos ainda não são confiáveis, pois apresentam reação cruzada com *Leishmania*, *Paracoccidioides* e fungos dematiáceos, fornecendo apenas um diagnóstico presumível da esporotricose (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

O diagnóstico baseado na amplificação de moléculas do ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir da PCR é uma técnica eficaz na identificação de micoses invasivas e consiste na metodologia mais utilizada para o diagnóstico molecular da esporotricose (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Trata-se de uma ferramenta molecular rápida, robusta e capaz de detectar pequenas quantidades de DNA do patógeno, além de identificá-lo em amostras biológicas complexas, sem necessidade do isolamento do microrganismo (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). Segundo Rodrigues, Hoog e Camargo (2015), a PCR pode detectar e identificar DNA de *S. schenckii* s.s. e *S. brasiliensis* até mesmo em amostras de baço, fígado, pulmões, coração, cérebro, rim e fezes em modelo murino de esporotricose disseminada. O primeiro ensaio de PCR para a identificação de *S. schenckii* foi desenvolvido por Kano *et al.* (2001), que utilizaram os *primers* S2/R2 projetados com base no gene da quitina sintase 1 (*CHS1*), o qual foi capaz de detectar 10 pg de DNA do patógeno. Posteriormente, Liu *et al.* (2013) aplicaram essa metodologia para o diagnóstico da esporotricose em amostras de lesão de pele utilizando os mesmos *primers*. Segundo os autores, 25 dos 30 casos testados (83,3%) apresentaram bandas positivas, enquanto que os cinco casos restantes, também, demonstraram resultado negativo no exame direto e não apresentaram crescimento em cultura (LIU *et al.*, 2013).

2.1.2 Formas clínicas e diagnóstico diferencial

No geral, as formas clínicas da esporotricose são divididas em cutâneas e extracutâneas (BARROS *et al.*, 2008). Porém, durante a epidemia zoonótica de esporotricose no Rio de Janeiro, manifestações clínicas incomuns foram identificadas, sugerindo uma nova classificação para melhor descrição da doença (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006). Segundo Orofino-Costa *et al.* (2017), a esporotricose pode apresentar-se sob a forma cutânea, mucosa, sistêmica, imunorreativa e de regressão espontânea (Figura 7).

Figura 7 - Diferentes apresentações clínicas da esporotricose humana



Fonte: Adaptado de Orofino-Costa *et al.* (2017).

Legenda: (A) Forma linfocutânea em adulto (linfangite ascendente); (B) forma linfocutânea no rosto de uma criança (linfangite descendente); (C) forma cutânea fixa no dorso da mão; forma sistêmica com lesões cutâneas disseminadas no tronco e membros superiores (D), rosto (E) e membros inferiores (F) em paciente com AIDS; (G) lesão granulomatosa na conjuntiva ocular da pálpebra superior; (H) lesão linfocutânea primária no dedo; (I) lesões pseudovesiculares nas costas - síndrome de Sweet (forma imunorreativa).

A forma cutânea da esporotricose geralmente desenvolve-se através de traumas gerados na epiderme, os quais possibilitam a entrada do fungo através da solução de continuidade da pele do hospedeiro. Por sua vez, o patógeno pode permanecer no tecido subcutâneo ou circular ao longo de vasos linfáticos adjacentes, caracterizando a forma fixa e linfocutânea, respectivamente (VÁSQUEZ-DEL-MERCADO; ARENAS; PADILLA-DESGARENES, 2012). Além disso, ocasionalmente, o fungo pode invadir a via sanguínea, constituindo a forma cutânea disseminada da doença (STALKUP; BELL; ROSEN, 2002).

Inicialmente, na forma linfocutânea forma-se uma lesão papulonodular no local da inoculação do fungo, a qual pode ulcerar e fistular expelindo uma secreção purulenta, caracterizando o chamado cancro de inoculação. Após algumas semanas, essas lesões, normalmente nódulos, seguem uma trajetória linfática regional, as quais ulceram, fistulam e

cicatrizam (CLEBAK; MALONE, 2018). Em geral, a forma fixa é representada por uma única lesão no sítio de infecção, sem envolvimento linfático, que é comumente ulcerada com bordas eritematosas, as quais podem regredir espontaneamente (ALMEIDA *et al.*, 2009). Alguns pacientes ainda apresentam múltiplas lesões cutâneas em locais não contíguos, com aparência polimórfica, todas surgindo ao mesmo tempo (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). A disseminação cutânea da esporotricose geralmente é observada em indivíduos imunossuprimidos, principalmente HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) positivos (DONABEDIAN *et al.*, 1994, SHAW; LEVINSON; MONTANARO, 1989).

Alguns autores consideram a forma mucosa uma variante da forma cutânea (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). Em pacientes com esporotricose o envolvimento da mucosa não é comum, embora quaisquer mucosas possam ser afetadas, preferencialmente da região ocular (VIEIRA-DIAS *et al.*, 1997), onde forma-se uma lesão granulomatosa com secreção serosa-purulenta, vermelhidão e presença ou não de edema palpebral (SCHUBACH *et al.*, 2005). As formas sistêmicas são mais raras e difíceis de diagnosticar. Nessa situação, o envolvimento osteoarticular e pulmonar são os mais comuns, porém existem relatos de casos envolvendo múltiplos órgãos, através da disseminação do fungo por via hematogênica (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006). Alguns pacientes podem apresentar uma resposta imune exacerbada contra o patógeno, acarretando no desenvolvimento de hipersensibilidade, onde os principais sintomas clínicos consistem na presença de eritema nodoso, eritema multiforme, síndrome de Sweet e artrite reativa. Por outro lado, existem indivíduos que apresentam regressão espontânea da doença (OROFINO-COSTA *et al.*, 2010; ZHANG; PYLA, 2014).

As formas clínicas e a morfologia das lesões características de esporotricose devem ser consideradas para o diagnóstico diferencial com outras doenças, as mais comuns incluem a LT, piodermite, doença da arranhadura do gato, nocardiose cutânea, cromomicose, sífilis, rosácea, granuloma anular, pioderma gangrenoso, osteomielite, tuberculose reumatóide, cutânea e pulmonar, lesões tumorais e meningite (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). Porém, devido às semelhanças clínicas (Figura 8) e laboratoriais e a sobreposição de áreas endêmicas, possuindo relatos de casos no Brasil e diversos outros países, a LT se tornou o principal diagnóstico diferencial da esporotricose (CHAKRABARTI *et al.*, 2015; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Sendo assim, as possibilidades de confusão diagnóstica são aumentadas, visto que essas evidências são utilizadas para a discriminação entre ambas as doenças (SANTOS *et al.*, 2007).

Figura 8 - Comparação entre as lesões de pacientes com esporotricose e LT



Fonte: (A) Adaptado de Orofino-Costa *et al.* (2017); (B) adaptado de Vries, Reedijk e Schallig (2015).
 Legenda: (A) Forma linfocutânea da esporotricose; (B) linfangite em paciente com LT.

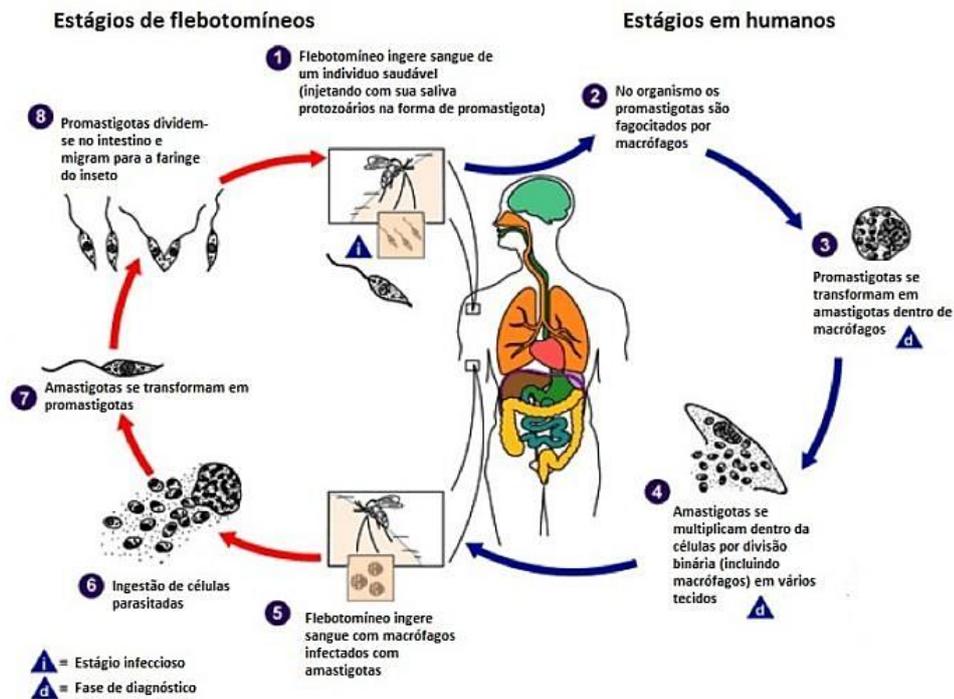
Em cães (FILGUEIRA, 2009; SOUZA *et al.*, 2009) e gatos (BRASIL, 2017; BRUM *et al.*, 2007) a esporotricose e a LT possuem lesões cutâneas caracterizadas por úlceras e formação de crostas, as quais exibem localização semelhante, preferencialmente na face (BRASIL, 2017; BRUM *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2009). Além disso, eventualmente, a intradermoreação de Montenegro (IDRM) e a sorologia apresentam reação cruzada entre a esporotricose e LT (LIMA BARROS *et al.*, 2005). No Rio de Janeiro, um estudo realizado com aplicação da IDRM em 107 casos de esporotricose, 48,6% apresentaram resultado positivo (BRITO *et al.*, 2007).

2.2 Leishmaniose tegumentar

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas, que por sua vez, podem infectar uma ampla variedade de mamíferos (AYATOLLAHI; BAFGHI, SHAHCHERAGHI, 2015; BRUSCHI; GRADONI, 2018; KARAMI *et al.*, 2013) (Figura 9). Endêmicas em mais de 98 países e em todos os territórios exceto Oceania, cerca de 350 milhões de pessoas encontram-se em situação de risco (ALVAR *et al.*, 2012). Anualmente, estima-se que

ocorram 0,9 a 1,6 milhão de novos casos de leishmanioses por ano (ALVAR *et al.*, 2012). As manifestações clínicas das leishmanioses são bastante diversas, sendo a leishmaniose visceral e a LT as principais formas da doença (BRUSCHI; GRADONI, 2018).

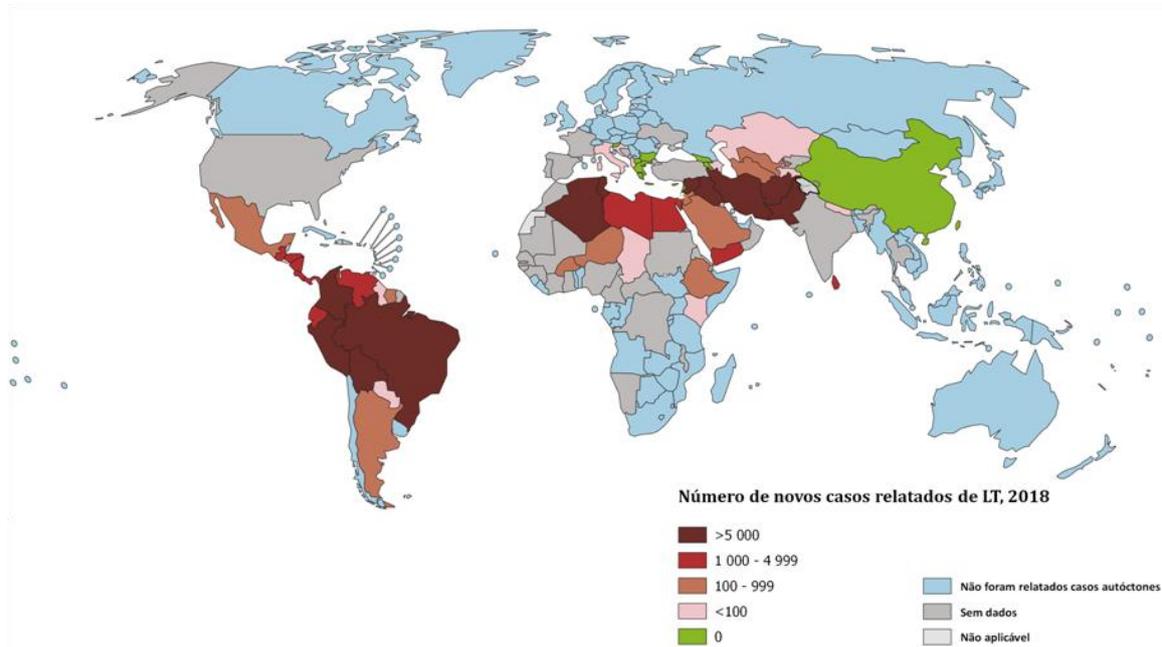
Figura 9 - Ciclo biológico de *Leishmania* spp.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2018).

A LT é a forma clínica mais prevalente em todo o mundo, sendo endêmica em 88 países (DASSONI *et al.*, 2013; ORYAN *et al.*, 2013). Contudo, países como Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, correspondem por 70 a 75% da incidência global estimada da LT (ALVAR *et al.*, 2012). No Brasil, está presente em todos os estados, sendo mais prevalente nas Regiões Norte e Nordeste. Em Pernambuco, a maioria dos municípios são endêmicos (ARAUJO *et al.*, 2016).

Figura 10 - Status de endemicidade da LT em todo o mundo, 2018



Fonte: Adaptado da Organização Mundial da Saúde (2018).

A LT acomete a pele e mucosa, cujas lesões geralmente se dispõem em partes expostas do corpo (GALVÃO *et al.*, 2018). A lesão inicial de LT surge no local da picada do vetor, apresentando-se tardiamente como uma pequena pápula e/ou nódulo eritematoso pruriginoso com envolvimento de linfonodos drenantes. Ainda, pode progredir para um granuloma, seguido da formação de uma placa (MACHADO *et al.*, 2002; VENDRAME *et al.*, 2010). As lesões podem cicatrizar espontaneamente ou evoluir para uma úlcera (GOTO; LINDOSO, 2012).

Os parasitos de *Leishmania* causadores de LT pertencem ao subgênero *Viannia* e *Leishmania*. No Brasil, já foram identificadas sete espécies responsáveis pela doença, sendo as três principais: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Outras espécies, como por exemplo, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lindenberg* e *Leishmania (Viannia) shawi*, também, já foram identificadas em estados das Regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2017). Eventualmente, essas espécies podem causar diferentes manifestações clínicas, incluindo a leishmaniose mucocutânea e, mais raramente, a leishmaniose cutânea difusa e disseminada (MARTINS *et al.*, 2014).

Além da variedade de formas clínicas da LT dependerem da espécie de *Leishmania* envolvida, essas espécies apresentam diferentes respostas às terapias usualmente empregadas. Sendo assim, a identificação específica do patógeno é primordial para o estabelecimento de

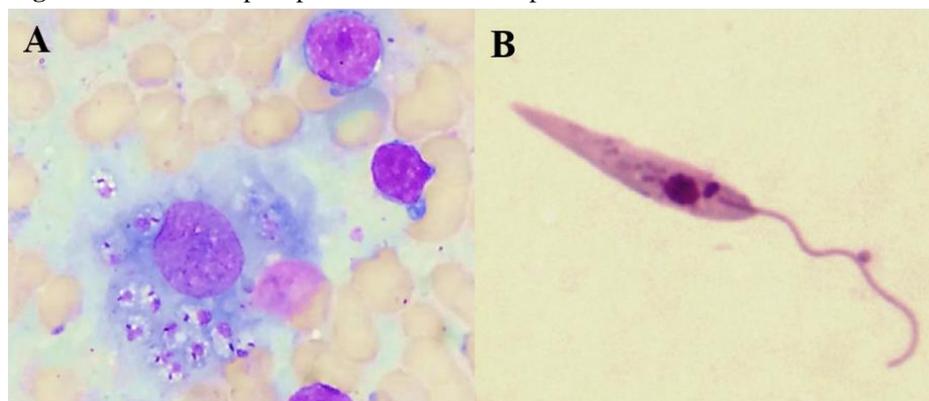
um tratamento adequado (HODIAMONT *et al.*, 2014). O diagnóstico da LT através da visualização do parasito costuma ser laborioso, porém, atualmente estão disponíveis novas técnicas que facilitam a identificação do mesmo (VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

2.2.1 Diagnóstico

Vários testes diagnósticos já foram descritos para o diagnóstico da LT, com precisões bastante variáveis, incluindo exame parasitológico direto, cultura, testes indiretos imunológicos e de diagnóstico molecular. Geralmente, a escolha entre esses testes diagnósticos é feita com base na disponibilidade dos recursos necessários para a aplicação da técnica (VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; GOTO; LINDOSO, 2012).

O exame direto seja da escarificação da borda da lesão, biópsia com impressão do fragmento cutâneo em lâmina ou punção aspirativa para visualização de formas amastigotas, e o crescimento em meio de cultura com o crescimento de formas promastigotas, são os métodos convencionais para o diagnóstico laboratorial da LT (BRASIL, 2017; VEGA-LÓPEZ, 2003). Na pesquisa direta, as formas amastigotas de *Leishmania* são observadas como corpos redondos ou ovais, de 2 a 4 μm de diâmetro, com núcleo e cinetoplasto característicos (ELMAHALLAWY *et al.*, 2014) (Figura 11). As amostras clínicas podem ser inoculadas em diferentes meios de cultura, incluindo o Novy-MacNeal-Nicolle e mantidas entre 24-25°C. Geralmente, as formas promastigotas (Figura 10) podem ser visualizadas após o quinto dia, porém as culturas não devem ser descartadas como negativas antes de quatro semanas (BRASIL, 2017). A combinação de ambas as técnicas (exame direto e cultura) aumenta a sensibilidade diagnóstica para cerca de 85% (BLUM *et al.*, 2004; RAMÍREZ *et al.*, 2000).

Figura 11 - Microscopia óptica de *Leishmania* sp.



Fonte: Adaptado de Erfe *et al.* (2012) e Figueredo (2016).

Legenda: (A) Formas amastigostas; (B) forma promastigota.

Em geral, os diagnósticos baseados no achado de formas amastigotas de *Leishmania* são difíceis de serem realizados, devido às lesões dos pacientes com LT apresentarem carga parasitária muito baixa, acarretando na redução da sensibilidade desses testes (VEGA-LÓPEZ, 2003). Além disso, mesmo com a observação das formas amastigotas, não é possível determinar um diagnóstico espécie-específico (HANDLER *et al.*, 2015). A cultura do patógeno pode ser considerada uma fonte para futura identificação da espécie, porém requer cerca de 10 dias para que seja alcançado um rendimento satisfatório de promastigotas para posterior identificação, como também, apresenta capacidade de cultivo variável para cada espécie (BOGGILD *et al.*, 2008). Logo, é recomendada a combinação com outras técnicas para o estabelecimento do diagnóstico (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

O diagnóstico sorológico da LT é baseado na presença de uma resposta humoral específica. Os títulos de anticorpos contra *Leishmania* são medidos principalmente por imunofluorescência indireta, western blot, testes de aglutinação direta, ensaios de fluxo lateral ou por ELISA (VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015). No entanto, devido à fraca resposta humoral provocada pela infecção e à consequente baixa sensibilidade, esses formatos não são usualmente empregados na rotina diagnóstica da LT (VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; GOTO; LINDOSO, 2010). Além disso, os anticorpos podem reagir de forma cruzada com anticorpos contra outros protozoários como o *Trypanosoma cruzi* (FABER *et al.*, 2003). A IDRM, um marcador da resposta imune celular, já foi empregada com mais frequência no diagnóstico imunológico da LT devido à sua simplicidade e alta sensibilidade (ANTONIO *et al.*, 2014). Entretanto, durante as seis primeiras semanas após o aparecimento da lesão, as reações de hipersensibilidade tardia a IDRM apresenta resultado negativo. Depois desse período, a IDRM costuma ser positiva em mais de 90% dos casos (BRASIL, 2017).

Vários testes moleculares já foram desenvolvidos para o diagnóstico da LT, visto que apresentam maior sensibilidade e especificidade em relação aos métodos tradicionais e permitem o uso de amostras menos invasivas para o diagnóstico (*e.g.*, swab da lesão) (ADAMS *et al.*, 2014; CRUZ *et al.*, 2013). Individualmente, ensaios baseados em PCR, seja como teste único, multiplex ou como um ensaio quantitativo, constituem a principal abordagem de diagnóstico molecular entre os pesquisadores e profissionais de saúde (REITHINGER; DUJARDIN, 2007). Geralmente, é utilizada em casos de lesões atípicas e com pouco número de parasitos, quando o método microscópico é negativo, ou para fins de pesquisa (KARAMIAN *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, vários testes de PCR para identificação de *Leishmania* spp. foram desenvolvidos com diferentes alvos moleculares, como sequências do DNA do cinetoplasto (kDNA) (SATOW *et al.*, 2013), citocromo b (KATO *et al.*, 2005), região 18S do ácido ribonucleico ribossomal (ULIANA *et al.*, 1991), além de alvos nucleares (CASTILHO *et al.*, 2003; CUPOLILLO *et al.*, 1995; FRAGA *et al.*, 2010). Em particular, o uso do kDNA resultou em uma melhora significativa na sensibilidade geral do teste, pois esse alvo molecular está presente em cerca de 10.000 ou mais cópias por parasita (NUZUM *et al.*, 1995; RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990). Segundo Marques *et al.* (2001), a PCR baseada na amplificação do kDNA revelou uma positividade de 100% à medida que os testes parasitológicos e IDRM apresentaram-se simultaneamente positivos, com uma redução da sensibilidade quando um ou ambos os testes foram negativos. Além disso, os autores demonstraram em campo a possibilidade de uma coleta simplificada, com preservação e extração de DNA de alto padrão, conforme necessário para o desenvolvimento de uma PCR confiável (MARQUES *et al.*, 2001).

A avaliação e comparação de métodos diagnósticos são muito importantes para determinar a forma mais rápida e eficaz de obter o diagnóstico preciso de doenças infecciosas e parasitárias. Além disso, a discriminação precisa da espécie causadora possui implicações terapêuticas e prognósticas consideráveis, como também, auxilia na elaboração de um planejamento exato e eficiente para o controle da doença (RASTI *et al.*, 2016). Nesse contexto, o diagnóstico através da PCR está sendo cada vez mais utilizado, uma vez que oferece o melhor em termos de sensibilidade e especificidade (CRUZ *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

3 JUSTIFICATIVA

Os altos índices de ocorrência da LT e a emergência de casos de esporotricose em alguns estados brasileiros tem chamado a atenção das autoridades de saúde e da comunidade científica. A esporotricose e a LT compartilham várias características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais, podendo acarretar em um possível erro de diagnóstico. Por sua vez, o diagnóstico errôneo pode levar à exposição desnecessária do paciente a um tratamento inadequado, como também, à adoção de medidas incorretas para vigilância e controle epidemiológico das doenças. O diagnóstico diferencial entre a esporotricose e a LT requer a identificação do agente etiológico em amostras obtidas da lesão cutânea. Porém, o isolamento e identificação dos patógenos são difíceis de serem realizados devido à baixa quantidade dos agentes nas lesões, além disso, demanda um longo tempo de espera para a obtenção do resultado. Nesse contexto, o diagnóstico através da PCR apresenta maior sensibilidade e especificidade, bem como, possibilita uma rápida identificação do agente etiológico. Ainda, a padronização de uma PCR duplex poderia reduzir o tempo e custos associados ao procedimento diagnóstico, devido à capacidade de detecção simultânea dos patógenos, contribuindo para a diferenciação entre a LT e a esporotricose, como também, auxiliando na escolha da abordagem terapêutica mais conveniente ao caso.

4 PERGUNTA CONDUTORA

É possível realizar o diagnóstico diferencial entre a esporotricose e a LT através de um protocolo baseado na PCR duplex?

5 HIPÓTESE

A técnica de PCR duplex é capaz de fornecer o diagnóstico diferencial entre a esporotricose e a LT.

6 OBJETIVOS

A seguir são descritos os objetivos geral e específicos do presente trabalho de dissertação de mestrado.

6.1 Objetivo geral

Padronizar um protocolo de PCR duplex para o diagnóstico diferencial da esporotricose por *S. schenckii s.s.* e LT por *L. braziliensis*.

6.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecer a especificidade e sensibilidade analítica de dois protocolos de PCR uniplex na detecção de DNA de *S. schenckii s.s.* e *L. braziliensis*;
- b) Estabelecer a especificidade e sensibilidade analítica da PCR duplex na detecção do DNA de *S. schenckii s.s.* e *L. braziliensis*.

7 METODOLOGIA

A seguir é descrita a metodologia do presente trabalho de dissertação de mestrado.

7.1 Aspectos éticos

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) (Projeto nº 084859/2018), como também, foi concedida anuência da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Memo nº 01/2018) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM).

7.2 Cepas de referência

Para a padronização da PCR duplex, foram utilizadas cepas de referência de *S. schenckii* s.s. (URM 4861) e de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) obtidas da Micoteca Universidade do Recife Micologia do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco e do Serviço de Referência em Leishmanioses do IAM, respectivamente. A cepa de *S. schenckii* s.s. foi cultivada em meio Ágar Sabouraud Dextrose (KASVI, Curitiba, Brasil) e incubada durante 10 dias a 25°C (MACÊDO-SALES *et al.*, 2018). Em seguida, os conídios foram coletados com auxílio de uma alça de inoculação através da raspagem do micélio com água destilada estéril. A concentração da suspensão foi determinada por contagem de conídios em câmara de Neubauer e portada a 10⁸ esporos/mL (MARIO *et al.*, 2017). Em contrapartida, o *pellet* de *L. braziliensis* cedido foi mantido em *freezer* a -20°C até o momento da extração de DNA.

7.3 Extração de DNA

A extração de DNA de *S. schenckii* s.s. foi realizada utilizando o kit Fast DNA Spin (MP Biomedicals, Vista, USA), seguindo as instruções do fabricante, com pequenas modificações descritas na literatura (RODRIGUES *et al.*, 2015; VESTY *et al.*, 2017). As modificações consistiram em acrescentar uma etapa de transferência das amostras para tubos Eppendorf de 2 ml contendo beads de cerâmica com 0,25 mm de diâmetro e matriz A, acrescidas com 1 ml de Cell Lysis Solution - Yeast (CLS-Y) (RODRIGUES *et al.*, 2015) e na ruptura mecânica das células, utilizando o Qiagen TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany)

a 30 Hz durante 50 segundos, por duas vezes, com um intervalo de 2 minutos com incubação das amostras em gelo (VESTY *et al.*, 2017).

A extração do DNA de promastigotas de *L. braziliensis* foram realizadas utilizando o kit comercial DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Germany), seguindo o protocolo do fabricante.

A concentração do DNA obtido foi determinada com o Qubit® 3.0 Fluorometer (ThermoFisher, Waltham, USA) utilizando o kit Qubit dsDNA High Sensitivity Assay (Life Technologies Corporation, Eugene, USA).

7.4 Primers

Os *primers* S2 (5'-TGGGCGTCTACCAAGAGGGTATTGC-3') e R2 (5'-GCACATGGGCTCAAGATCAAAGGCC-3') desenhados com base em um fragmento com 318 pb do gene *CHS1*, foram utilizados para detecção de *S. schenckii s.s.* (KANO *et al.*, 2001). Com relação à *L. braziliensis*, a detecção foi realizada utilizando os *primers* B1 (5'-GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG-3') e B2 (5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3'), desenhados a partir da região conservada do kDNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, o qual amplifica um fragmento de 750 pb (BRUIJN; BARKER, 1992).

7.5 Ensaio de PCR uniplex e duplex

Inicialmente, os *primers* descritos acima foram testados individualmente com os seus respectivos alvos, com base nos protocolos descritos por Kano *et al.* (2001) e Bruijn e Barker (1992). Posteriormente, foram realizados testes com diferentes temperaturas a fim de encontrar uma temperatura de anelamento que permitisse a amplificação de ambos fragmentos desejados.

Para padronização da PCR duplex, uma matriz de diluição de *primers*, Taq DNA polimerase e MgCl₂ foi feita para determinar uma concentração ótima dos reagentes. Ajustes na temperatura de anelamento foram realizados, até que os alvos fossem amplificados simultaneamente e de forma equivalente. Ademais, foram realizados ensaios no formato uniplex para *S. schenckii s.s.* e *L. braziliensis*, a partir das condições de reação e ciclagem da PCR duplex padronizada, para comparação da sensibilidade e especificidade analítica obtidas em ambos os sistemas.

Os controles positivos (curva de diluição) consistiram em DNA extraído de *S. schenckii s.s.* e de *L. braziliensis*, enquanto que amostras de DNA de humano, cão e gato sabidamente não infectados foram usadas como controle negativo. Além disso, foi testada uma reação de controle sem DNA (*no template control* - NTC).

As reações foram realizadas em triplicata em um Bioer LifePro thermal cycler (Bioer Technology, Tokyo, Japan). Os produtos de cada PCR (10 µl) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio (10 mg/ml), usando marcador de peso molecular 100 pb (Quatro G, Porto Alegre, Brasil ou Ludwig Biotecnologia, Alvorada, Brasil) e visualizados por transiluminação por UV.

7.6 Sensibilidade e especificidade analítica

Para análise da sensibilidade analítica, foram preparadas curvas de diluições decimais seriadas (5 ng, 0,5 ng, 50 pg, 5 pg e 0,5 pg por reação) de DNA de *S. schenckii s.s.* e *L. braziliensis*. Nos ensaios, as curvas foram utilizadas como alvo para determinar o limite de detecção de cada *primer*. A especificidade analítica foi verificada a partir de testes cruzados com os *primers* S2/R2 e B1/B2 e seus respectivos alvos.

A PCR uniplex foi avaliada apenas com um par de *primer* (S2/R2 ou B1/B2) e seu respectivo alvo (*S. schenckii s.s.* ou *L. braziliensis*), enquanto que a PCR duplex foi realizada com uma mistura contendo os dois pares de *primers* (S2/R2 e B1/B2) e apenas um alvo (*S. schenckii s.s.* ou *L. braziliensis*), como também, com os dois alvos simultaneamente (*S. schenckii s.s.* e *L. braziliensis*), para verificar a influência desses fatores na sensibilidade e especificidade analítica dos ensaios.

8 RESULTADOS

A seguir são descritos os resultados do presente trabalho de dissertação de mestrado.

8.1 Padronização da PCR uniplex e duplex

Vários experimentos de amplificação preliminares foram realizados durante o processo de padronização dos protocolos de PCR. Os resultados de sensibilidade e especificidade analítica obtidos nos diferentes ensaios foram considerados como parâmetros para o estabelecimento dos volumes e concentrações dos reagentes, bem como, das condições de ciclagem da PCR uniplex e duplex (Quadro 1). Em particular, para otimização do desempenho das reações, foi necessário o aumento da concentração do $MgCl_2$ e da Taq DNA polimerase, o ajuste nas concentrações dos *primers* para o equilíbrio da eficiência e o estabelecimento de uma temperatura de anelamento em que os pares de *primers* atingissem um desempenho equivalente. Também, é válido ressaltar, que na PCR duplex, as amostras de DNA de cada alvo foram testadas tanto individualmente, como também, em combinação, com os dois pares de *primers* sendo utilizados simultaneamente. Logo, para realização da PCR uniplex, cuja reação possuía apenas um alvo e seu respectivo par de *primer*, os volumes dos reagentes foram reajustados conforme necessário para que o mesmo volume final (50 μ L) fosse mantido em ambos os sistemas (Quadro 1).

Quadro 1 - Padronização das condições de reação e ciclagem da PCR uniplex e duplex

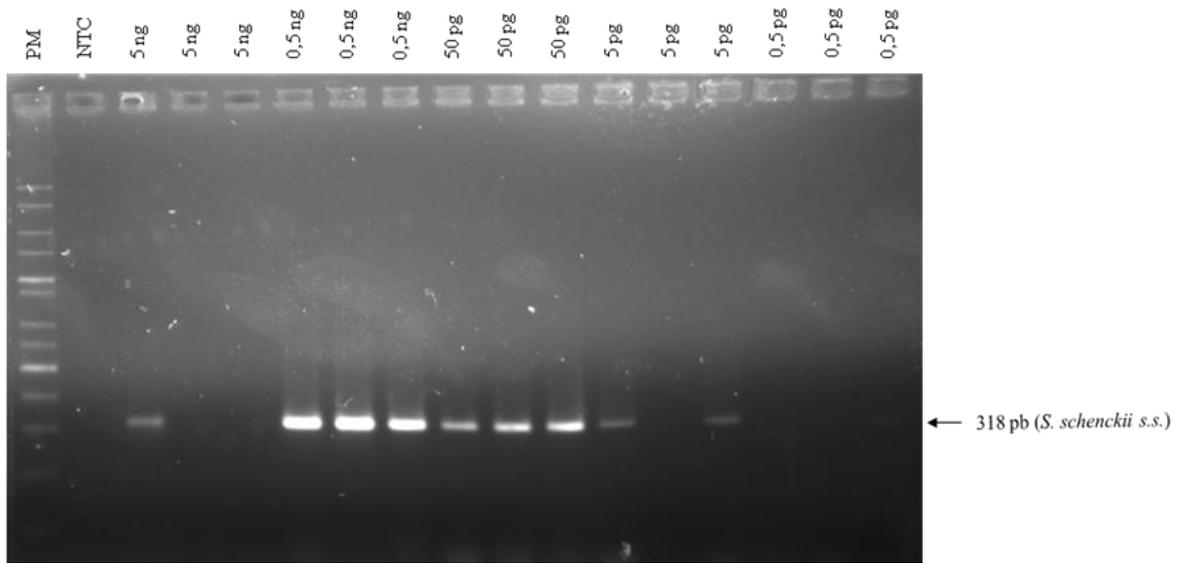
Master Mix		
Componentes	Concentração final	Volume por reação
H ₂ O	-	33 µl (PCR uniplex) e 30 µl (PCR duplex)
10× PCR Buffer livre de MgCl ₂ (200 mM Tris HCl (pH 8.4), 500 mM KCl)	1× PCR Buffer livre de MgCl ₂ (20 mM Tris HCl (pH 8.4), 50 mM KCl)	5 µl
10 mM dNTPs	0,2 mM de cada dNTP	1 µl
50 mM MgCl ₂	2,5 mM MgCl ₂	2,5 µl
<i>Primers</i> senso	20 pmol (B1) e/ou 5 pmol (S2)	1 µl (por <i>primer</i>)
<i>Primers</i> anti-senso	20 pmol (B2) e/ou 5 pmol (R2)	1 µl (por <i>primer</i>)
Gelatina (0,01 %)	0,001 %	5 µl
Taq DNA Polimerase (5 U/µl)	2,5 U	0,5 µl
Amostra de DNA	5 ng, 0,5 ng, 50 pg, 5 pg e 0,5 pg	1 µl (PCR uniplex) e 2 µl (PCR duplex)
Condições de ciclagem		
Ciclos	Temperatura/tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95° C/5 min	1
Desnaturação	95° C/30 seg	35
Anelamento	67,5° C/1 min	35
Extensão	72° C/30 seg	35
Extensão final	72° C/10 min	1

Fonte: A autora (2019).

8.2 Sensibilidade analítica

Os ensaios de PCR uniplex e PCR duplex amplificaram produtos do tamanho esperado para as espécies de *S. schenckii* s.s. (~ 318pb) e *L. braziliensis* (~ 750 pb). A PCR uniplex para *S. schenckii* s.s. apresentou um limite de detecção de 5 pg (Figura 12), enquanto que a PCR uniplex para *L. braziliensis* apresentou um limite de 0,5 pg (Figura 13). O limite de detecção na PCR duplex foi de 0,5 pg para ambos os alvos, seja na detecção individual (Figura 14 e 15), seja na detecção simultânea (Figura 16).

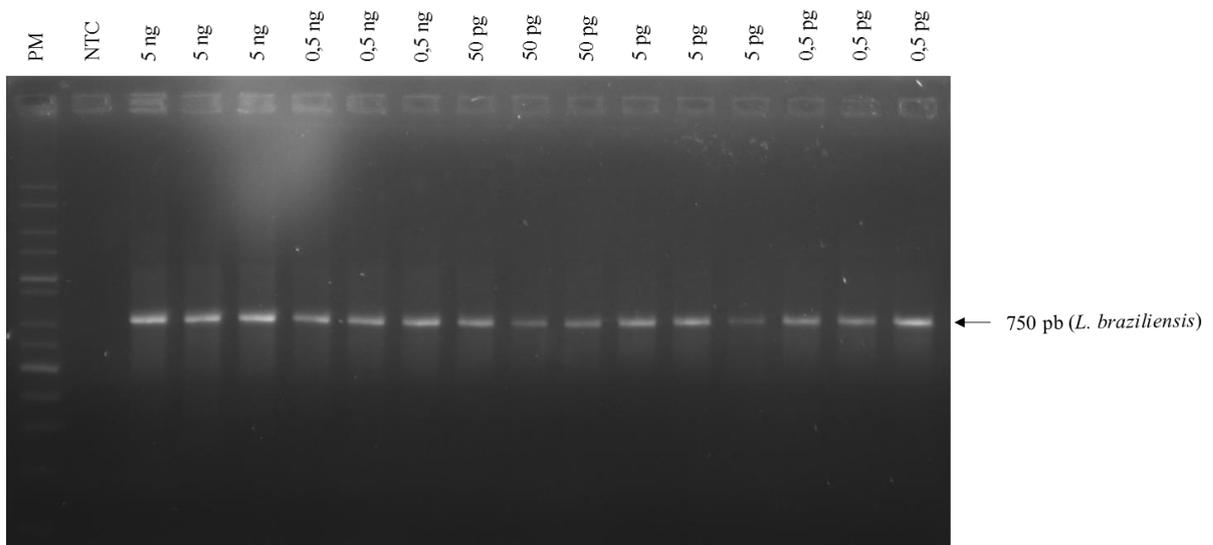
Figura 12 - Reprodutibilidade e sensibilidade analítica da PCR uniplex para *S. schenckii* s.s.



Fonte: A autora (2019).

Legenda: Peso molecular (PM); *No template control* (NTC).

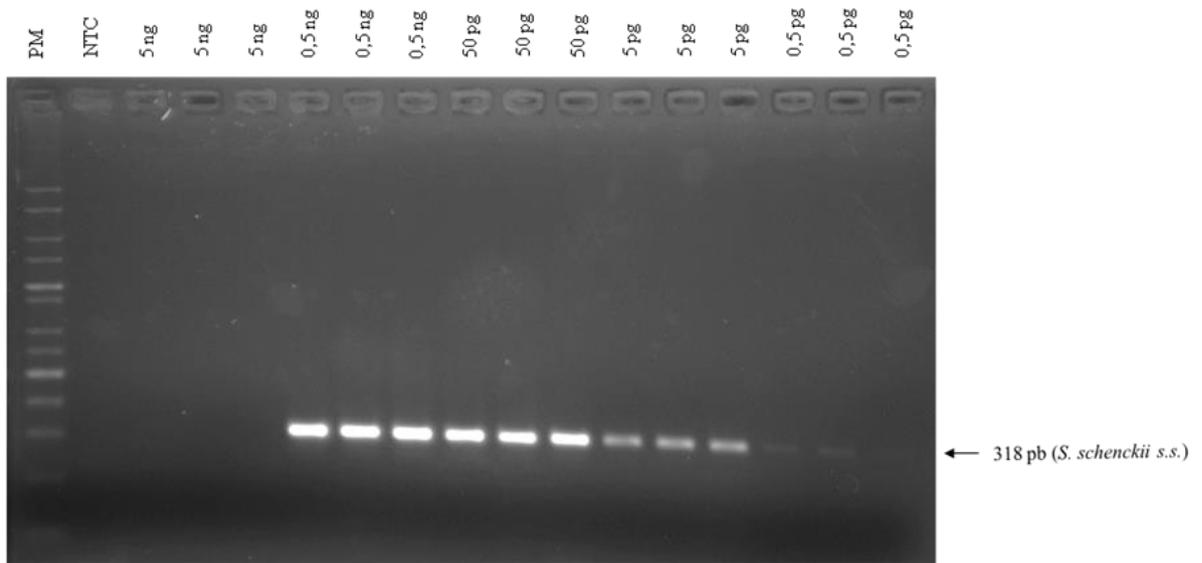
Figura 13 - Reprodutibilidade e sensibilidade analítica da PCR uniplex para *L. braziliensis*



Fonte: A autora (2019).

Legenda: Peso molecular (PM); *No template control* (NTC).

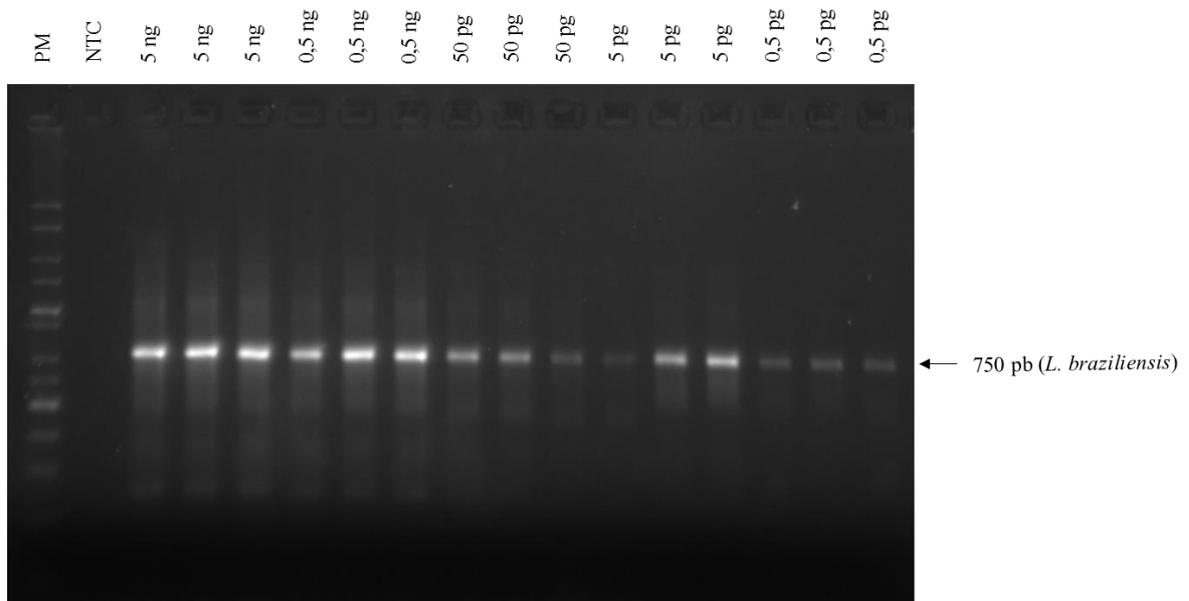
Figura 14 - Reprodutibilidade e sensibilidade analítica da PCR duplex para *S. schenckii* s.s.



Fonte: A autora (2019).

Legenda: Peso molecular (PM); *No template control* (NTC).

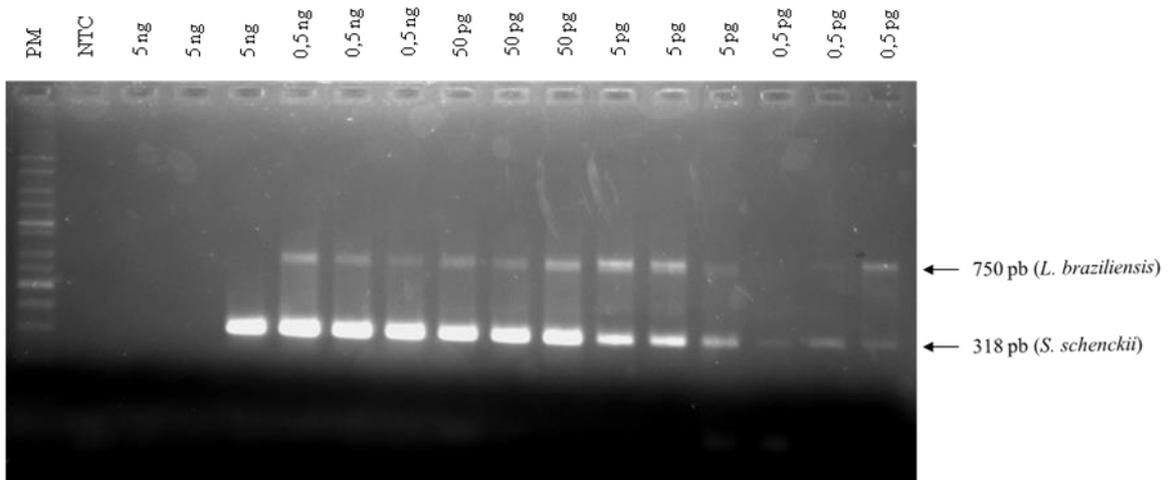
Figura 15 - Reprodutibilidade e sensibilidade analítica da PCR duplex para *L. braziliensis*



Fonte: A autora (2019).

Legenda: Peso molecular (PM); *No template control* (NTC).

Figura 16 - Reprodutibilidade e detecção simultânea de *S. schenckii s.s.* e *L. braziliensis* na PCR duplex



Fonte: A autora (2019).

Legenda: Peso molecular (PM); *No template control* (NTC).

8.3 Reprodutibilidade

Em determinados experimentos, não houve amplificação em algumas repetições das triplicadas (Figuras 12, 14 e 16).

8.4 Especificidade analítica

A partir dos testes cruzados com os *primers* S2/R2 e B1/B2 foi observada amplificação específica do DNA dos seus respectivos alvos, com formação de um fragmento com 318 pb para *S. schenckii s.s.* e 750 pb para *L. braziliensis*, respectivamente. Também, não foi observada amplificação com DNA de humano, cão e gato.

9 DISCUSSÃO

No presente estudo foi padronizada uma PCR duplex para o diagnóstico simultâneo da infecção por *S. schenckii* s.s. e *L. braziliensis*. A PCR duplex detectou até 0,5 pg de DNA de *S. schenckii* s.s. e *L. braziliensis*, simultaneamente. Em trabalhos anteriores realizados por Kano *et al.* (2001) e Liu *et al.* (2013), nos quais desenvolveram sistemas de PCR uniplex para espécies do complexo *S. schenckii* com os *primers* S2/R2, foi observado um limite de detecção de 10 pg e 5 pg, respectivamente. Por outro lado, Bruijn e Barker (1992) relataram uma sensibilidade de 1 pg na detecção de *L. braziliensis* com os *primers* B1/B2. Apesar desses protocolos visarem à amplificação de apenas um alvo, eles apresentaram um limite de detecção menor ao relatado no presente trabalho. Além disso, Rodrigues-Brito *et al.* (2015) descreveram uma PCR multiplex capaz de realizar a diferenciação entre espécies de *Sporothrix* spp. e *Leishmania mexicana*, porém obteve uma sensibilidade analítica muito inferior (40 vezes menor) em relação ao da PCR duplex padronizada no presente estudo.

Markoulatos, Siafakas e Moncany (2002) relataram que em ensaios de PCR multiplex, mesmo que os *primers* trabalhem juntos em uma reação sem mostrar reatividade cruzada ou produção de artefatos, ainda é muito provável que eles difiram em eficiência. Além disso, Polz e Cavanaugh (1998) demonstraram que a presença de dois ou mais alvos em uma mesma reação de PCR, pode resultar em maiores taxas de amplificação de uma sequência alvo em detrimento de outra. Em suma, os achados apresentados nesse estudo corroboram com os resultados descritos pelos autores supracitados, já que durante o desenvolvimento da PCR duplex foi observado inicialmente um padrão distinto de eficiência entre os pares de *primers*, que acarretou na amplificação preferencial de um dos alvos. Ainda assim, ajustes nas concentrações dos *primers* foram capazes de garantir uma amplificação uniforme dos dois alvos.

De modo geral, a comparação dos protocolos descritos acima, sugere que alterações nas condições de reação da PCR podem favorecer melhores respostas em termos de sensibilidade, além de resultar em taxas de amplificação iguais para todos os alvos em um sistema multiplex (MARKOULATOS; SIAFAKAS; MONCANY, 2002; SINT; RASO; TRAUGOTT, 2012).

Na maior parte das reações de PCR uniplex e duplex, realizadas em triplicata, foi observada reprodutibilidade do resultado. Contudo, na PCR uniplex para detecção de *S. schenckii* e nos ensaios duplex incluindo uma mistura de DNA de ambos os organismos, a reprodutibilidade diminuiu conforme as amostras apresentavam quantidades de DNA

próximas ao limite de detecção. Esses achados corroboram com os resultados obtidos por Sint, Raso e Traugott (2012), os quais demonstraram que quando os ensaios de PCR chegaram próximos ao limite de detecção, a reprodutibilidade dos resultados foi prejudicada. Esse fato pode acontecer, por exemplo, devido à baixa quantidade de DNA alvo disponível na reação.

Em contrapartida, no ponto com a maior quantidade de DNA na curva de diluição, observou-se que não ocorreu formação das bandas esperadas em determinados ensaios. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), o excesso de DNA pode resultar na falha completa da reação, devido ao alto grau de impurezas agregadas, enquanto que, concentrações muito baixas também poderão induzir amplificações inespecíficas ou não amplificação. Diante disso, percebe-se que a adequação da concentração de DNA é um parâmetro crítico para obtenção de ensaios de PCR com amplificações específicas e reprodutíveis.

A análise comparativa dos formatos de PCR uniplex e duplex indicou que não houve redução em termos de sensibilidade e especificidade quando o formato multiplex foi testado. Outros ensaios de PCR realizados para detecção de *S. schenckii* e *Leishmania mexicana*, também, não relataram alterações no limite de detecção e especificidade entre os sistemas uniplex e duplex (RODRÍGUES-BRITO *et al.*, 2015). Esses resultados contrastam com os estudos realizados por Brownie *et al.* (1997) e Polz e Cavanaugh (1998), os quais observaram em ensaios multiplex uma redução desses parâmetros, devido a possível ocorrência de amplificação preferencial de uma sequência alvo e formação de heterodímeros.

Ainda, é válido ressaltar, que além de não ser apresentada redução da sensibilidade analítica com inclusão de ambos os *primers* e amostras de DNA, no trabalho atual, a PCR duplex demonstrou um limite de detecção 10 vezes maior em relação ao obtido no ensaio uniplex com os *primers* S2/R2. Esses dados são discordantes dos obtidos por Elnifro *et al.* (2000), que afirmaram que ajustes nos constituintes do tampão, dNTPs e concentrações de enzimas na PCR multiplex, resultam em pouca ou nenhuma melhora na sensibilidade, em comparação com os resultados obtidos nos formatos uniplex. Diante disso, a PCR duplex desenvolvida no presente estudo, além de apresentar o potencial de produzir economias de tempo e esforço no laboratório, devido à capacidade de detecção simultânea dos alvos, não comprometeu a sensibilidade do teste.

Os pares de *primers* produziram 100% de especificidade quando avaliados de forma cruzada entre os alvos (*i.e.*, *S. schenckii* *s.s.* e *L. braziliensis*) e DNA de humano, cão e gato. A avaliação da especificidade entre os três últimos organismos foi fundamental, uma vez que independente do tipo de amostra e método de extração, deve-se considerar a presença do

DNA do hospedeiro nas amostras (SIBLEY *et al.*, 2009). Além disso, os pares de *primers* S2/R2 e B1/B2, também, já foram testados previamente contra diferentes alvos (*e.g.*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *H. capsulatum*, *Leishmania infantum*, *T. cruzi*) e não apresentaram reação positiva (BRUIJN; BARKER, 1992; KANO *et al.* 2001; LIU *et al.*, 2013).

Em resumo, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a PCR duplex é um método específico e sensível para a detecção simultânea de *S. schenckii s.s.* e *L. braziliensis*. Essa abordagem fornece uma melhoria significativa das práticas atuais, já que nos métodos tradicionais a demonstração direta e cultivo dos agentes etiológicos podem levar vários dias e os resultados são frequentemente inconclusivos (PEARSON; SOUSA, 1996; RODRIGUES; HOOG; CAMARGO, 2015). Contudo, antes da aplicação clínica, faz-se necessária a avaliação do protocolo de PCR duplex com amostras de pacientes com LT e/ou esporotricose para validação dessa abordagem.

10 CONCLUSÕES

Os ensaios de PCR uniplex e duplex permitiram a detecção de pequenas quantidades de DNA de *S. schenckii s.s.* e *L. braziliensis* e não apresentaram amplificações inespecíficas ou cruzadas com o DNA dos outros organismos testados (*i.e.*, humano, cão e gato).

11 PERSPECTIVAS

O sistema de PCR duplex padronizado no presente estudo poderá ser utilizado na rotina de laboratórios clínicos, centros de pesquisa e universidades como uma ferramenta rápida e eficiente no diagnóstico diferencial da LT e esporotricose. Para isso, sugere-se que em trabalhos futuros sejam realizados estudos de validação com amostras clínicas, bem como, a comparação do método molecular aqui desenvolvido com as técnicas convencionais (i.e. cultura e exame direto) de detecção de *L. braziliensis* e *S. schenckii s.s.*, para avaliação da sensibilidade, especificidade e valores preditivos entre essas metodologias.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, E. R. *et al.* Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. **Parasitology**, London, v. 141, n. 14, p.1891-1897, 2014.
- ALBORNOZ, M. B.; VILLANUEVA, E.; TORRES, E. D. Application of immunoprecipitation techniques to the diagnosis of cutaneous and extracutaneous forms of sporotrichosis. **Mycopathologia**, The Hague, v. 85, n. 3, p.177-183, 1984.
- ALMEIDA, H. L. Jr. *et al.* Spontaneous resolution of zoonotic sporotrichosis during pregnancy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 51, n. 4, p.237-238, 2009.
- ALMEIDA-PAES, R. *et al.* Use of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 14, n. 3, p.244-249, 2007.
- ALVAR, J. *et al.* leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 5, p.e35671, 2012.
- ANTONIO, L. F. *et al.* Montenegro skin test and age of skin lesion as predictors of treatment failure in cutaneous leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 56, n. 5, p.375-380, 2014.
- ARAÚJO, A. K. L.; LEAL, C. A. S. Esporotricose felina no município de Bezerros, Agreste Pernambucano: Relato de caso. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Maringá, v. 10, n. 11, p.816-820, 2016.
- ARAÚJO, A. R. *et al.* Risk factors associated with American cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 58, p.86-86, 2016.
- ARAÚJO, M. L. *et al.* Human sporotrichosis beyond the epidemic front reveals classical transmission types in Espírito Santo, Brazil. **Mycoses**, Berlin, v. 58, n. 8, p.485-490, 2015.
- ARENAS, R. *et al.* Sporotrichosis: from KOH to molecular biology. **Journal of Fungi**, Basel, v. 4, n. 2, p.e62, 2018.
- ARRILLAGA-MONCRIEFF, I. *et al.* Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clinical Microbiology And Infection**, Paris, v. 15, n. 7, p.651-655, 2009.
- AYATOLLAHI, J.; BAFGHI, F. A.; SHAHCHERAGHI, H. S. Chronic zoster-form: a rare variant of cutaneous leishmaniasis. **Reviews in Medical Microbiology**, London, v. 26, n. 3, p.114-115, 2015.
- BARROS, M. B. L. *et al.* An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 136, n. 9, p.1192-1196, 2008.

BARROS, M. B.; PAES, R. A.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 24, n. 4, p.633-654, 2011.

BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, M. J. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 83, p.165-191, 2016.

BLUM, J. *et al.* Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 53, n. 2, p.158-166, 2004.

BLUMER, S. O. *et al.* Comparative evaluation of five serological methods for the diagnosis of sporotrichosis. **Applied Microbiology**, Washington, v. 26, n. 1, p.4-8, 1973.

BOGGILD, A. K. *et al.* Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 79, n. 6, p.847-852, 2008.

BONIFAZ, A.; TIRADO-SÁNCHEZ, A. Cutaneous Disseminated and Extracutaneous Sporotrichosis: Current Status of a Complex Disease. **Journal of Fungi**, Basel, v. 3, n. 1, p.6, 2017.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189 p.

BRITO, M. M. *et al.* Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. **Medical Mycology**, Oxford, v. 45, n. 8, p.721-729, 2007.

BROWNIE, J. *et al.* The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, n. 16, p.3235-3241, 1997.

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

BRUM, L. C. *et al.* Principais dermatoses zoonóticas de cães e gatos. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 69, p.29-46, 2007.

BRUSCHI, F.; GRADONI, L. **The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases**. Cham: Springer, 2018. 245 p.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 392, n. 10151, p.951-970, 2018.

CASTILHO, T. M.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 2, p.540-546, 2003.

CHAKRABARTI, A. *et al.* Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, Oxford, v. 53, n. 1, p.3-14, 2015.

CLAVIJO-GIRALDO, D. M. *et al.* Analysis of *Sporothrix schenckii sensu stricto* and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 122, n. 2016, p.73-77, 2016.

CLEBAK, K. T.; MALONE, M. A. Skin Infections. **Primary Care**, Philadelphia, v. 45, n. 3, p.433-454, 2018.

CRUZ, I. *et al.* An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, New York, v. 134, n. 3, p.281-289, 2013.

CUPOLILLO, E. *et al.* Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 73, n. 1-2, p.145-155, 1995.

DASSONI, F. *et al.* Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis resembling borderline-tuberculoid leprosy: a new clinical presentation? **Acta Dermato-venereologica**, Stockholm, v. 93, n. 1, p.74-77, 2013.

DONABEDIAN, H. *et al.* Disseminated cutaneous and meningeal sporotrichosis in an AIDS patient. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 18, n. 2, p.111-115, 1994.

ELFRINO, E. M. *et al.* Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, p.559-570, 2000.

ELMAHALLAWY, E. K. *et al.* Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, v. 8, n. 8, p.961-972, 2014.

ERFE, M. C. *et al.* Efficacy of synthetic peptides RP-1 and AA-RP-1 against *Leishmania* species in vitro and in vivo. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 2, p.658-665, 2012.

FABER, W. R. *et al.* Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Saint Louis, v. 49, n. 1, p.70-74, 2003.

FERREIRA, M.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 1998. 220 p.

FILGUEIRA, K. D. Esporotricose na espécie canina: relato de um caso na cidade de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 2, p.673-677, 2009.

FRAGA, J. *et al.* Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p.238-245, 2010.

GALVÃO, E. L. *et al.* Development and initial validation of a cutaneous leishmaniasis impact questionnaire. **Plos One**, San Francisco, v. 13, n. 8, p.1-19, 2018.

- GEZUELE, E.; ROSA, D. Importance of the sporotrichosis asteroid body for the rapid diagnosis of sporotrichosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 22, n. 3, p.147-150, 2005.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, London, v. 8, n. 4, p.419-433, 2010.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p.293-307, 2012.
- GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 13, n. 1, p.e1006077, 2017.
- GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. *et al.* Epidemiological aspects of sporotrichosis epidemic in Brazil. **Current Fungal Infection Reports**, Philadelphia, v. 9, n. 4, p.238-245, 2015.
- HANDLER, M. Z. *et al.* Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Saint Louis, v. 73, n. 6, p.927-928, 2015.
- HODIAMONT, C. J. *et al.* Species-directed therapy for leishmaniasis in returning travellers: a comprehensive guide. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 5, p.e2832, 2014.
- HU, S. *et al.* Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 4, p.1414-1418, 2003.
- KANO, R. *et al.* Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene. **Mycoses**, Berlin, v. 44, n. 7-8, p.261-265, 2001.
- KARAMI, M.; DOUDI, M.; SETORKI, M. Assessing epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Isfahan, Iran. **Journal of Vector Borne Diseases**, Delhi, v. 50, n. 1, p.30-37, 2013.
- KARAMIAN, M. *et al.* Atypical presentation of Old-World cutaneous leishmaniasis, diagnosis and species identification by PCR. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, Amsterdam, v. 22, n. 8, p.958-962, 2008.
- KATO, H. *et al.* Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v 72, n. 1, p.87-93, 2005.
- LACAZ, C. S. *et al.* **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p.
- LARONE, D. H. **Medically important fungi: a guide to identification**. 4. ed. Washington: Asm Press, 2002. 409 p.

- LIMA BARROS, M. B. *et al.* Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. **Acta Tropica**, Basel, v. 93, n. 1, p.41-47, 2005.
- LIU, X. *et al.* Rapid identification of *Sporothrix schenckii* in biopsy tissue by PCR. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, Amsterdam, v. 27, n. 12, p.1491-1497, 2013.
- LOPES-BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 2, p.293-308, 2006.
- MACÊDO-SALES, P. A. *et al.* Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: a comparison between infected and non-infected populations. **BMC veterinary research**, London, v. 14, n. 1, p.1-10, 2018.
- MACHADO, P. *et al.* Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, Chicago, v. 12, n. 34, p.69-73, 2002.
- MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. **Dermatology Research and Practice**, Cairo, v. 2014, p.1-13, 2014.
- MARIO, D. N. *et al.* *Sporothrix brasiliensis* produces the highest levels of oxidative stress in a murine model among the species of the *Sporothrix schenckii* complex. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 4, p.554-557, 2017.
- MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 16, n. 1, p.47-51, 2002.
- MARQUES, M. J. *et al.* Simple form of clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 65, n. 6, p.902-906, 2001.
- MARQUES-MELO, E. H. *et al.* Felino doméstico como agente transmissor de esporotricose para humano: relato do primeiro caso no estado de alagoas. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 38, n. 2, p.490-498, 2014.
- MARTINS, A. L. *et al.* American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 1, p.52-58, 2014.
- MIRANDA, L. H. *et al.* Histopathology of canine sporotrichosis: a morphological study of 86 cases from Rio de Janeiro (2001-2007). **Mycopathologia**, The Hague, v. 168, n. 2, p.79-87, 2009.
- MORRIS-JONES, R. Sporotrichosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, Oxford, v. 27, n. 6, p.427-431, 2002.

NEGRINI, T. de C. *et al.* Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix schenckii*. **Immunological Investigations**, New York, v. 42, n. 1, p.36-48, 2013.

NUNES, G. D. L. *et al.* Esporotricose felina no município de Itaporanga, estado da Paraíba, Brasil: relato de um caso. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, Umuarama, v. 14, n. 2, p.157-161, 2011.

NUZUM, E. *et al.* Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by use of the polymerase chain reaction on patient blood. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 171, n. 3, p.751-754, 1995.

OLIVEIRA, M. M. *et al.* Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 31, n. 1, p.2-6, 2014.

OLIVEIRA, M. M. *et al.* Rapid identification of *Sporothrix* species by T3B fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 6, p.2159-2162, 2012.

OROFINO-COSTA, R. *et al.* Arthritis as a hypersensitivity reaction in a case of sporotrichosis transmitted by a sick cat: clinical and serological follow up of 13 months. **Mycoses**, Berlin, v. 53, n. 1, p.81-83, 2010.

OROFINO-COSTA, R. *et al.* Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 5, p.606-620, 2017.

ORYAN, A. *et al.* Genetic diversity of *Leishmania major* strains isolated from different clinical forms of cutaneous leishmaniasis in southern Iran based on minicircle kDNA. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, Amsterdam, v. 19, p.226-231, 2013.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, Chicago, v. 22, n. 1, p.1-13, 1996.

PEREIRA, S. A. *et al.* Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. **The Veterinary record**, London, v. 166, n. 10, p.290-294, 2010.

POLZ, M. F.; CAVANAUGH, C. M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 10, p.3724-3730, 1998.

RAMÍREZ, J. R. *et al.* Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 10, p.3768-3773, 2000.

RASTI, S. *et al.* Comparison of molecular, microscopic, and culture methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 30, n. 5, p.610-615, 2016.

- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 1, p.21-25, 2007.
- RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, New York, v. 71, n. 3, p. 267-275, 1990.
- RODRIGUES, A. M. *et al.* Rapid identification of emerging human-pathogenic *Sporothrix* species with rolling circle amplification. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, p. e1385, 2015.
- RODRIGUES, A. M. *et al.* *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. **Fungal Biology**, Amsterdam, v. 120, n. 2, p.246-264, 2016.
- RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 12, p.e0004190, 2015.
- RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal-animal transmission. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 12, n. 7, p.e1005638, 2016.
- RODRÍGUEZ, G.; SARMIENTO, L. The asteroid bodies of sporotrichosis. **The American Journal of Dermatopathology**, New York, v. 20, n. 3, p.246-249, 1998.
- RODRIGUEZ-BRITO, S. *et al.* Differential identification of *Sporothrix* spp. and *Leishmania* spp. by conventional PCR and qPCR in multiplex format. **Medical Mycology**, Oxford, v. 53, n. 1, p.22-27, 2015.
- RUDRAMURTHY, S. M.; CHAKRABARTI, A. Sporotrichosis: update on diagnostic techniques. **Current Fungal Infection Reports**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p.134-140, 2017.
- SANTOS, I. B. *et al.* Sporotrichosis: the main differential diagnosis with tegumentary leishmaniasis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, n. 1, p.1-6, 2007.
- SATOW, M. M. *et al.* Applicability of KDNA-PCR for routine diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a tertiary reference hospital. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 55, n. 6, p.393-399, 2013.
- SCHUBACH, A. *et al.* Primary conjunctival sporotrichosis: two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cornea**, New York, v. 24, n. 4, p.491-493, 2005.
- SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, n. 6, p.e1296, 2017.

SHAW, J. C.; LEVINSON, W.; MONTANARO, A. Sporotrichosis in the acquired immunodeficiency syndrome. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 21, n. 52, p.1145-1147, 1989.

SIBLEY, L. D. *et al.* Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, London, v. 364, n. 1530, p.2749-2761, 2009.

SILVA, G. M. *et al.* Surto de esporotricose felina na região metropolitana do Recife. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 9, p.1767-1771, 2018.

SILVA, M. B. T. *et al.* Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 10, p.1867-1880, 2012.

SINT, D.; RASO, L.; TRAUGOTT, M. Advances in multiplex PCR: balancing *primer* efficiencies and improving detection success. **Methods in Ecology and Evolution**, Hoboken, v. 3, n. 5, p.898-905, 2012.

SOUZA, N. T. *et al.* Esporotricose canina: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p.572-576, 2009.

STALKUP, J. R.; BELL, K.; ROSEN, T. Disseminated cutaneous sporotrichosis treated with itraconazole. **Cutis**, New York, v. 69, n. 5, p.371-374, 2002.

SUN, L. *et al.* Dacryocystitis due to *Sporothrix* inoculated via an unusual mode: Case report. **Medicine**, Hagerstown, v. 97, n. 25, p.11182-11182, 2018.

ULIANA, S. R. *et al.* *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. **Experimental Parasitology**, New York, v. 72, n. 2, p.157-163, 1991.

VÁSQUEZ-DEL-MERCADO, E.; ARENAS, R.; PADILLA-DESGARENES, C. Sporotrichosis. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 30, n. 4, p.437-443, 2012.

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 16, n. 2, p. 97-101, 2003.

VENDRAME, C. M. *et al.* Insulin-like growth factor-I induced and constitutive arginase activity differs among isolates of *Leishmania* derived from patients with diverse clinical forms of *Leishmania braziliensis* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 104, n. 8, p.566-568, 2010.

VESTY, A. *et al.* Evaluating the Impact of DNA Extraction Method on the Representation of Human Oral Bacterial and Fungal Communities. **Plos One**, San Francisco, v. 12, n. 1, p.e0169877, 2017.

VIEIRA-DIAS, D. *et al.* Ocular and concomitant cutaneous sporotrichosis. **Mycoses**, Berlin, v. 40, n. 5-6, p.197-201, 1997.

VRIES, H. J.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. **American Journal of Clinical Dermatology**, Auckland, v. 16, n. 2, p.99-109, 2015.

ZHANG, Y. *et al.* Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. **Persoonia**, Leiden, v. 35, p.1-20, 2015.

ZHANG, Y.; PYLA, V. Sweet's syndrome-like sporotrichosis. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 53, n. 5, p.324-325, 2014.

ZHOU, X. *et al.* Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 66, n. 1, p.153-165, 2014.

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



Título do Projeto: "Padronização de uma PCR duplex para diagnóstico diferencial da leishmaniose tegumentar e esporotricose"

Pesquisador responsável: Filipe Dantas Torres

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apreciação ao CEP: 13 de novembro de 2018

Registro no CAAE: 94758418.3.0000.5190

Número do Parecer na Plataforma Brasil: 3.017.231

PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

O CEP/CPqAM reforça a necessidade de entrega de relatórios parcial e final, em cumprimento à Resolução CNS 466/12, capítulo XI, artigo 2d.

Recife, 30 de janeiro de 2019

Janaina Campos de Miranda

Coordenadora do CEP/CPqAM/Fiocruz

Janaina Campos de Miranda
Pesquisadora em Saúde Pública
Coordenadora
Mat. SIAPE 464777
CEP / CPqAM / FIOCRUZ

ANEXO B - CARTA RESPOSTA DA CEUA



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Aggeu Magalhães

Comissão de Ética no Uso de Animais

Recife, 01 de novembro de 2018

Carta Resposta ao Memo nº 01/2018

Ao Pesquisador: **Filipe Dantas Torres**

Informamos que o projeto intitulado "PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR DUPLEX PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E ESPOROTRICOSE" não teve nenhuma pendência sob o ponto de vista da CEUA, tendo o referido protocolo de pesquisa toda relevância, tanto para diagnóstico diferencial de leishmaniose tegumentar (LT) quanto para esporotricose. As amostras clínicas secundárias que serão utilizadas contam com as anuências, tanto do Laboratório Central de Saúde Pública LACEN-PE (órgão público fornecedor das amostras), quanto do serviço de referência em Leishmanioses desta instituição. Esta anuência solicitada a esta CEUA foi discutida e aprovada em plenária na reunião que ocorreu em 24/09/2018 e foi deferida por todos os presentes. Sendo assim, esta Coordenação reitera vosso pedido e deferimento de vossa solicitação de anuência.

Cordialmente,

Lindomar José Pena
 Coordenador CEUA/IAM

Lindomar José Pena
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
 Mat. Siapex: 1971435
 e-mail: Lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br
 IAM / Fiocruz