

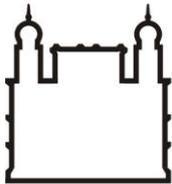
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Mestrado em Medicina Tropical

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE METODOLOGIAS BASEADAS
NA PCR PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR E IDENTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE
AGENTES ETIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR QUE CIRCULAM EM
ÁREAS ENDÊMICAS BRASILEIRAS**

GRAZIELLE CARDOSO DA GRAÇA

Rio de Janeiro

2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Mestrado em Medicina Tropical

GRAZIELLE CARDOSO DA GRAÇA

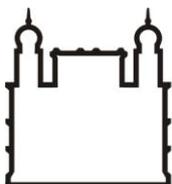
Desenvolvimento e avaliação comparativa de metodologias baseadas na PCR para o diagnóstico molecular e identificação específica de agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar que circulam em áreas endêmicas brasileiras

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre Ciências.

Orientador: Dra. Elisa Cupolillo

Rio de Janeiro

2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Mestrado em Medicina Tropical

AUTORA: GRAZIELLE CARDOSO DA GRAÇA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE METODOLOGIAS BASEADAS
NA PCR PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR E IDENTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE
AGENTES ETIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR QUE CIRCULAM EM
ÁREAS ENDÊMICAS BRASILEIRAS**

ORIENTADOR : Dra. Elisa Cupolillo

Aprovada em: 20/09/2011

EXAMINADORES:

Dr^a Constança Felícia De Paoli de Carvalho Britto (Presidente)

Dr^a Alda Maria da Cruz (Membro)

Dr^a Maria de Fátima Madeira (Membro)

Dr^a Martha Cecilia Suárez-Mutis (Suplente / Revisora)

Aos meus pilares sólidos, Luiz Carlos, Lúcia e Getulio.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dr^a Elisa Cupolillo pela amizade e ensinamentos dedicados a realização desse trabalho e a minha formação profissional.

Ao Dr^o Gabriel Grimaldi por toda contribuição intelectual e também suporte logístico.

Ao Dr^o Renato Porrozi pela ajuda com a parte experimental.

Aos amigos do LPL Rozane Temporal, Luiz Eduardo Paes, Antônio Teva, Selma Quintela, Valmir Quintela, Henrique Martins, Bárbara Neves, Patrícia Cuervo, Hellen Cristina Padilha, Mariana Boite, Amanda Cavalcanti, Camila Mesquita, Avatar Martins, Marcos Trannin e Taíse Salgado pelos bons momentos e a ajuda quando necessária.

Aos grandes amigos que passaram pelo LPL e deixaram muitas saudades, ensinamentos e gargalhadas Lilia Firoozmand, Camila Lemos, Leonardo Rocha, Marcus Vinícius Santos, Leonardo Alves, Simone Neves, Cíntia Santos, Taíssa Pereira, Carolina Trindade e Pamella Macedo.

Aos amigos Neide Apolinário, Evelyn Neves, Grace Bastos, Jaqueline Bastos, Giselle Borges, Vanessa Picolo, Leonardo Passareli, Julia Santos, Guaraci Dias e Edson Louzada pelo grande apoio.

À Plataforma de Genômica – seqüenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ, pelo apoio técnico.

A FIOCRUZ e o CNPq pelo apoio estrutural e financeiro para a realização desse trabalho.

Aos meus pais por toda paciência do mundo, incentivo, dedicação, amor e carinho.

Aos meus padrinhos Carlos André da Graça e Maria de Fátima da Graça por todos os conselhos sábios.

A minha tia Nilza da Graça (*i.m*) pelo imensurável incentivo.

A minha avó Neuza Braga (*i.m*) por todas as palavras certas nas horas certas e por todos os sorrisos.

A toda minha família por tudo.

A Luiz Carlos Ferrari Filho por ter sido extremamente solícito quando foi necessário, por ter tido muita paciência e principalmente por ser a escada da minha subida, o amor da minha vida, o abrir de olhos do amanhecer, a verdade que me leva a viver, a espera na janela, a ave que vem de longe tão bela, a esperança que arde em calor, e finalmente a tradução do que é o amor.

A todas as pessoas que influenciaram de alguma maneira na execução desse trabalho.

Muito Obrigada!

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO

- 1.1. Leishmaniose: aspectos epidemiológicos e etiológicos.....1
- 1.2. Leishmaniose: aspectos clínicos e diagnóstico7

2. OBJETIVOS

- 2.1. Objetivos gerais.....14
- 2.2. Objetivos específicos.....14

3. METODOLOGIA

- 3.1. Descrição das etapas experimentais.....15
- 3.2. Seleção das cepas de *Leishmania*, infecção de hamsters (*Mesocricetus auratus*) e diagnóstico parasitológico da infecção.....17
- 3.3. Amostras de pacientes clinicamente diagnosticados com LC.....25
- 3.4. Extração de DNA das diversas fontes e quantificação.....26
- 3.5. Mistura artificial de DNA humano e promastigota.....28
- 3.6. Reações de PCR empregadas29
- 3.7. Sequenciamento.....35
- 3.8. RFLP (“Restriction fragment length polymorphism”) dos produtos de PCR.....36
- 3.9. Análise estatística.....36

4. RESULTADOS

- 4.1. Limite de detecção e capacidade de discriminação de espécies de todos os alvos utilizados empregando DNA de promastigota.....37
- 4.2. Avaliação da inibição da PCR em presença de DNA humano.....50

4.3. Avaliação da sensibilidade de cada alvo usando fragmentos de tecidos coletados de animais experimentais, infectados com diferentes espécies de <i>Leishmania</i> , e processados de diversas formas.....	51
4.4. Percentual de positividade dos diversos alvos frente a material clínico e capacidade em identificar espécies de <i>Leishmania</i>	55
DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	76

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1: Distribuição geográfica da Leishmaniose Cutânea no mundo.....2**
- Figura 1.2: Ciclo de vida de *Leishmania* spp.....5**
- Figura 1.3: Distribuição de espécies de *Leishmania* agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar no Brasil – 2005.....7**
- Figura 1.4: Diversidade de manifestações clínicas observadas na Leishmaniose Tegumentar. A- Lesão cutânea localizada, B- Lesão muco-cutânea e C- forma cutânea difusa.....9**
- Figura 3.1: Esquema apresentando as regiões internas do gene *hsp70* amplificadas considerando uma sequência de 1.400bp. Também estão apresentadas as sequências e algumas características dos iniciadores utilizados para amplificação de cada região e o tamanho do produto esperado.....34**
- Figura 4.1: Produto da amplificação por PCR direcionadas para os alvos kDNA, ITS-1 e *hsp70* (1.400pb) empregando DNA de promastigotas de *Leishmania guyanensis* em diferentes concentrações. Gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídeo e visualizado por luz ultravioleta. As setas indicam o tamanho (em pares de base) do produto amplificado para cada alvo. 100bp= marcador de peso molecular de 100 pares de base.....37**
- Figura 4.2: Produto da amplificação por PCR direcionadas para os alvos *hsp70A*, *hsp70B*, *hsp70 C* e *hsp70D* empregando DNA de promastigotas de *Leishmania braziliensis* em diferentes concentrações. Gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídeo e visualizado por luz ultravioleta. As setas indicam o tamanho (em pares de base) do produto amplificado para cada alvo. 100bp= marcador de peso molecular de 100 pares de base.....38**
- Figura 4.3: Perfis de PCR RFLP de kDNA de cepas de *Leishmania*, com as enzimas *Apa*LI, *Taq*I, *Bst*UI, *Hae*III e *Ava*LI. bp= tamanho em pares de base do marcador de peso molecular; *Lb*, *L. braziliensis*; *Lg*, *L. guyanensis*; *Ls*, *L. shawi*; *Ln*, *L. naiffi* , *Ll*, *L. lainsoni* *La*, *L. amazonensis*; *Li*, *L. infantum*.....39**

Figura 4.4: Perfis de PCR-RFLP de ITS1 observado para cepas de referência de diferentes espécies de *Leishmania* após a digestão do produto de PCR com a enzima *Sau3AI*. Gel de poliacrilamida 12,5% (Genephor®) corado pela prata. bp= tamanho em pares de base do marcador de peso molecular 50pb; *Lg*, *L. guyanensis*; *Lb*, *L. braziliensis*; *LI*, *L. lainsoni*; *Ln*, *L. naiffi*; *Ls*, *L. shawi*; *La*, *L. amazonensis*; *Li*, *L. infantum*.....40

Figura 4.5: Perfis de PCR-RFLP de *hsp70* 1.400bp observado para cepas de referência de diferentes espécies de *Leishmania* após a digestão do produto de PCR com as enzimas *BstUI* e *HaellI*. Gel de poliacrilamida 12,5% (Genephor®) corado pela prata. PM= marcador de peso molecular 50pb. *Lg*, *L. guyanensis*; *Lb*, *L. braziliensis*; *LI*, *L. lainsoni*; *Ln*, *L. naiffi*; *Ls*, *L. shawi*; *La*, *L. amazonensis*; *Li*, *L. infantum*.....41

Figura 4.6: Perfis de PCR-RFLP de *hsp70C* observados para cepas de referência de diferentes espécies de *Leishmania* após a digestão do produto com as enzimas *HaellI*, *BstUI* e *Mbol*. Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata. PM= marcador de peso molecular de 100bp. *Lg*, *L. guyanensis*; *Lb*, *L. braziliensis*; *La*, *L. amazonensis*; *Li*, *L. infantum*; *LI*, *L. lainsoni*; *Ls*, *L. shawi*; *Ln*, *L. naiffi*.....42

Figura 4.7: Alinhamento das sequências obtidas para cepas de referência de algumas espécies de *Leishmania* após o sequenciamento dos produtos de PCR amplificados correspondentes a região *hsp70C*. A- Captura de imagem de parte do alinhamento. B- Polimorfismos encontrados, com as suas respectivas posições. (Imagens obtidas a partir do programa MEGA) 565 *L.guyanensis*, 566 *L.braziliensis*, 575 *L.amazonensis*, 1023 *L.lainsoni*, 1365 *L.naiffi* e 1545 *L.shawi*...43

Figura 4.8: Aposição em lâminas de fragmentos de biópsia de lesões de hamsters experimentalmente infectados com *L.amazonensis* e coradas com Giemsa: Observação de formas amastigotas interiorizadas em macrófagos, que estão indicadas por setas vermelhas na figura. A-20x, B-40x e C-100x.....51

Figura 4.9: Aposição em lâminas de fragmentos de biópsia de lesões de hamsters experimentalmente infectados com diferentes espécies e corados com Giemsa: Observação de formas amastigotas interiorizadas em macrófagos , que estão indicadas pelas setas vermelhas na figura (100x). A-*L.guyanensis*, B-*L.braziliensis* e C-*L.naiffi*.....51

Figura 4.10: PCR-RFLP ITS1 após digestão com a enzima Sau3AI observado em gel de acrilamida 12,5%, corado pela prata. Os perfis apresentados correspondem as cepas de referência de *L. lainsoni* (*L.l*) e *L. naiffi* (*L.n*) e a uma amostra (RB004) de paciente com diagnóstico de leishmaniose que para este marcador apresentou um perfil misto entre as espécies citadas.....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Identificação das cepas de referência utilizadas nos ensaios de PCR, com suas respectivas espécies e zimodemas.....	18
Tabela 3.2: Painel de cepas de <i>Leishmania</i> com suas respectivas espécies e zimodemas, representativo das diversas espécies patogênicas ao homem que circulam no Brasil, utilizadas nos ensaios de PCR para verificação da capacidade destes em discriminar espécies.....	19
Tabela 3.3: Identificação de cepas de <i>Leishmania</i> , com suas respectivas espécies e zimodemas, utilizadas na infecção de <i>Mesocricetus auratus</i> para obtenção de tecidos infectados, extração de DNA e posterior utilização nos ensaios de PCR.....	23
Tabela 3.4: Descrição dos protocolos utilizados para as diferentes reações de PCR visando a amplificação dos alvos kDNA, ITS-1 e <i>hsp70</i>	31
Tabela 3.5: Condições de temperatura, tempo e ciclos utilizadas para a amplificação dos alvos kDNA, ITS1, <i>hsp70</i> e <i>g6p</i>	32
Tabela 3.6: Sequências dos iniciadores utilizadas para amplificação do gene <i>g6p</i>	33
Tabela 3.7: Protocolos utilizados nas reações de PCR para amplificação do gene <i>g6p</i> usando as diferentes combinações de iniciadores.....	33
Tabela 4.1. Cepas de <i>Leishmania</i> (N=70) previamente caracterizadas por MLEE e utilizadas para validar a capacidade dos ensaios de PCR em distinguir diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	44
Tabela 4.2: Diagnóstico clínico-parasitológico de animais experimentalmente infectados com espécies de <i>Leishmania</i> e resultado das reações de PCR para diferentes alvos empregando DNA extraído de diferentes tipos de amostras preparadas com tecidos coletados destes animais.....	53
Tabela 4.3: Acurácia diagnóstica determinada para os marcadores kDNA, ITS1 e <i>hsp70C</i> , analisando diferentes tipos de amostras.....	54

Tabela 4.4: Detecção e identificação de <i>Leishmania spp.</i> por diferentes métodos baseados na PCR empregando 99 amostras de DNA extraídos de tecido coletado de lesões de pacientes com diagnóstico clínico de leishmaniose.....	55
Tabela 4.5: Positividade das PCRs kDNA, ITS1, <i>g6p</i> e <i>hsp70C</i> quando aplicadas a amostras de DNA extraído de fragmentos de tecido coletados de pacientes com diagnóstico clínico de leishmaniose.....	59
Tabela 4.6: Positividade das PCRs de kDNA, ITS1 e <i>hsp70C</i>, aplicadas em amostras de posições em Papel de filtro.....	62
Tabela 4.7: Positividade das PCRs de ITS1 e <i>hsp70C</i>, aplicado as amostras de posições em lâminas coradas pelo método de Giemsa.....	62



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

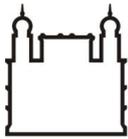
Desenvolvimento e avaliação comparativa de metodologias baseadas na PCR para o diagnóstico molecular e identificação específica de agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar que circulam em áreas endêmicas brasileiras

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Grazielle Cardoso da Garça

A leishmaniose é um complexo de doenças caracterizada não só pelo considerável pleomorfismo clínico, mas também pela variação epidemiológica, devido à notável diversidade de espécies de *Leishmania* e de vetores envolvidos no ciclo de transmissão e, quando aplicável, os seus grupos de reservatórios. O diagnóstico da infecção por *Leishmania* associado à identificação da espécie causal é importante para o prognóstico, definição de esquemas terapêuticos adequados e para vigilância epidemiológica da doença. Neste contexto, os métodos baseados na PCR tem sido os mais investigados e por isso muitos métodos tem sido descritos. O principal objetivo deste estudo foi estabelecer uma metodologia que apresentasse uma boa sensibilidade para ser utilizada no diagnóstico da leishmaniose cutânea e que fosse capaz de identificar o agente etiológico causal da infecção ao nível específico. Para isto, neste trabalho utilizamos diferentes metodologias baseadas na PCR que já foram empregadas em vários estudos enfocando o diagnóstico molecular das leishmanioses: PCR kDNA, PCR ITS1 e PCR *g6p*. O limite de detecção, sensibilidade frente a amostras clínicas obtidas de pacientes com LC e a capacidade destas metodologias em discriminar entre as espécies relacionadas com a LC humana no Brasil foram avaliados. Além disso, considerando resultados anteriores do nosso grupo que indicaram que regiões do gene *hsp70* poderiam ser utilizadas para o alcance deste objetivo, desenvolvemos metodologias de PCR direcionadas para a amplificação de fragmentos que correspondiam a distintas regiões do gene *hsp70*, com tamanho variando entre 230pb a 390pb. Considerando as quatro regiões que foram analisadas, escolhemos uma (aqui denominada de PCR *hsp70C*) por ter apresentado o melhor limite de detecção de DNA de *Leishmania* e que, através da PCR RFLP *hsp70C*, foi capaz de discriminar todas as espécies de *Leishmania*, patógenos humanos, que circulam no Brasil, quando cepas de referência foram analisadas. A sensibilidade da PCR *hsp70C* empregando DNA extraído de tecido coletado de pacientes diagnosticados com leishmaniose foi avaliada, comparando com as demais metodologias mencionadas anteriormente; além disso, a capacidade da PCR-RFLP em identificar espécies de *Leishmania* foi validada empregando um painel de 70 cepas de *Leishmania*, representando as diferentes espécies e a distribuição geográfica destas, e também foi aplicada ao material clínico analisado. Foi possível concluir que a PCR kDNA é um método bastante sensível e por isso indicado para o diagnóstico molecular das leishmanioses, mas não permite a identificação de espécies. A PCR ITS1 apresenta boa sensibilidade para o diagnóstico das leishmanioses, mas a capacidade de identificação de algumas espécies de *Leishmania* que circulam nas Américas, através da PCR-RFLP, depende de metodologias mais complexas, dificultando seu uso em áreas de circulação de espécies como *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, por exemplo. Finalmente, A PCR-RFLP *hsp70C*, direcionada para a amplificação de uma região do gene *hsp70* de *Leishmania*, combina boa sensibilidade para detectar *Leishmania* diretamente em material clínico e a habilidade em identificar todas as espécies que circulam no Brasil, sendo útil principalmente em áreas onde existe a ocorrência de espécies de *Leishmania* em simpatria.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Development and benchmarking methodologies based on PCR for molecular diagnosis and specific etiologic agents of cutaneous leishmaniasis circulating in Brazil endemic areas.

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

Grazielle Cardoso da Graça

Leishmaniasis is zoonosis caused by parasite protozoa belonging to the genus *Leishmania*, which comprises about 30 species, and of these about 20 are responsible for causing human diseases. Leishmaniasis is characterized by considerable clinical pleomorphism and epidemiological variability. Diagnosis of *Leishmania* infection associated with the identification of the causative species is important for prognosis, definition of appropriate treatment schemes and epidemiological surveillance of the disease. In this context, PCR-based methods have been the most investigated and therefore many methods have been described, although there are still limitations in terms of validation and ability to discriminate between different *Leishmania* species. In Brazil there are at least seven species associated with human cutaneous Leishmaniasis (CL) and one species associated with visceral *Leishmaniasis*. The main goal of this study was to establish a methodology presenting both good sensitivity and capacity to identify the causative etiologic agent of the infection at species level. To this end, this study employed different methodologies based on PCR already used in several studies focusing on the molecular diagnosis of Leishmaniasis: kDNA PCR, ITS1 PCR and *g6p* PCR. The limit of detection, sensitivity in the face of clinical samples obtained from patients diagnosed with CL and the ability of these methodologies to discriminate between species related to human CL in Brazil were evaluated. Furthermore, considering previous results from our group showing that regions of the *hsp70* gene could be used to achieve this goal, we developed PCR-based methodologies targeting fragments that correspond to different *hsp70* gene regions, with sizes ranging from the 230pb to 390pb. Considering the four regions that were analyzed, we chose one (here named as *hsp70C* PCR) for having presenting the best detection limit of *Leishmania* DNA and the capacity of discriminating human pathogens *Leishmania* species that circulate in Brazil, when reference strains were analyzed by PCR RFLP *hsp70C*. The sensitivity of *hsp70C* PCR using DNA extracted from tissue collected from patients diagnosed with CL compared with the other methods mentioned above. In addition, the ability of *hsp70C* PCR-RFLP to identify *Leishmania* species has been validated using a panel of 70 *Leishmania* strains, representing different species and geographic regions additionally clinical material was also analyzed. The results suggest that kDNA PCR is a very sensitive method and therefore suitable for the molecular diagnosis of Leishmaniasis, but does not allow the identification of the species involved in the infection. The ITS1 PCR is quite sensitive for the diagnosis of Leishmaniasis, but the non ability to identify the sympatric species like *L.guyanensis* and *L.braziliensis*, by PCR-RFLP limits its use in some in the South America. Finally, PCR-RFLP *hsp70C*, combines good sensitivity to detect *Leishmania* DNA extracted from clinical material and the ability to identify all *Leishmania* species that circulate in Brazil, being particularly useful in areas where *Leishmania* species are simpatric.

1.INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose: aspectos epidemiológicos e etiológicos.

A leishmaniose é uma zoonose causada por um protozoário heteroxênico, do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), que compreende um complexo de doenças com uma importante diversidade clínica e epidemiológica. O gênero *Leishmania* compreende cerca de 30 espécies, das quais 20 são responsáveis por causar doenças em humanos (Desjeux, 2004).

A leishmaniose é caracterizada não só pelo considerável pleomorfismo clínico, mas também pela variação epidemiológica, devido à notável diversidade de espécies de *Leishmania* e de vetores envolvidos no ciclo de transmissão e, quando aplicável, os seus grupos de reservatórios. Os parasitas do gênero *Leishmania* estão associados a diferentes ciclos de transmissão, envolvendo ou não reservatórios primários, mamíferos de diversas ordens, silvestres ou sinantrópicos. Os ciclos de transmissão podem ser zoonóticos, antroponóticos ou antroponótico, dependendo da espécie do parasita que está sendo transmitida e a região geográfica. Por exemplo, é evidente a transmissão antroponótica de *L. donovani* em regiões da Índia, Nepal e Bangladesh, assim como no leste da África (WHO, 2010). Da mesma forma, *L. tropica* está associada a ciclos antroponóticos (WHO, 2010). Porém, a maioria das espécies de *Leishmania*, incluindo todas as que circulam no Brasil, estão associadas a ciclos zoonóticos ou antroponóticos. Estes parasitas são transmitidos para os hospedeiros vertebrados por flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), principalmente espécies dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (WHO, 2010).

A doença é endêmica em regiões tropicais e subtropicais, apresentando ampla distribuição geográfica, ocorrendo em 98 países distribuídos em 4 continentes. Somente em 33 países esta doença é notificada (WHO, 2010). A Organização Mundial da Saúde estima que existam 12 milhões de doentes no Mundo, com 350 milhões de indivíduos vivendo em áreas de risco. Nas Américas, ambas as formas da doença, leishmaniose visceral (LV) e tegumentar (LT) são comuns e representam problema de saúde pública. Dados recentes indicam um aumento significativo no número de casos de leishmaniose visceral e tegumentar em populações urbanas do Brasil. Em 2009 foram registrados 3.693 casos de LV e 21.824 casos de LT (WHO, 2010). O estado do Tocantins é o que apresenta maior

concentram na região Nordeste, seguida da região Centro-Oeste (Manual de Leishmaniose Visceral Grave, 2006). Neste país, epidemias urbanas foram observadas em várias cidades, demonstrando um número crescente de casos registrados em áreas urbanas, que se constituem como novos focos e tem merecido especial atenção (Gontijo and Melo, 2004). Outro fator que aponta para importância da Leishmaniose é sua categorização como uma doença oportunista, claramente evidenciado pela sua relação com pacientes infectados pelo vírus HIV. Além disso, a expansão da epidemia acometendo grupos de indivíduos jovens ou com comorbidades tem ocasionado número elevado de óbitos (Cota *et al.*, 2011).

Embora existam poucos relatos de LV associadas a outras espécies (Souza *et al.*, 2011; Camara *et al.*, 2006; Rodriguez-Bonfante *et al.*, 2003), geralmente esta doença está relacionada a espécies do complexo *L. donovani*, sendo *L. infantum* o principal agente da LV antroponozoonótica. Os cães são, em geral, considerados como o principal hospedeiro e reservatório da *L. infantum* e, portanto, desempenham um papel importante no ciclo de transmissão do parasita. A progressão da leishmaniose visceral canina (LVC) durante a infecção, no entanto, é muito variável entre os cães infectados; alguns animais podem permanecer assintomáticos, enquanto outros sofrem sintomas graves que podem levar à morte precoce (Alvar *et al.*, 2004). Por outro lado, cães infectados, independente de apresentarem manifestação clínica ou não, comumente apresentam parasitismo cutâneo, que é crucial para a dinâmica da transmissão da doença, agindo como uma fonte de infecção para flebotomíneos (Silva *et al.* 2001).

Nas últimas décadas, as análises epidemiológicas das leishmanioses têm sugerido mudanças no padrão de transmissão da doença, inicialmente considerada zoonose de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com as florestas. Posteriormente, a doença começou a ocorrer em zonas rurais, já praticamente desmatadas, e em regiões peri-urbanas. Observa-se a existência de três perfis epidemiológicos: (a) Silvestre – em que ocorre a transmissão em áreas de vegetação primária (zoonose de animais silvestres); (b) Ocupacional ou lazer – em que a transmissão está associada a exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias e ecoturismo (antroponozoonose) e (c) Rural ou peri-urbana – em áreas de colonização (zoonose de matas residuais) ou peri-urbana, em que houve adaptação do vetor ao peri-domicílio (zoonose de matas

residuais e/ou antroponose) (Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana - LTA, 2010).

Também tem sido reportadas mudanças na epidemiologia em diferentes áreas endêmicas de leishmanioses. Isso inclui, entre outros, o surgimento de novos focos endêmicos (Sharma *et al.* 2005; Rhajaoui *et al.* 2007; Karunaweera *et al.*, 2003) a disseminação de parasitas para novas áreas (Nasereddin *et al.*, 2005; Capelli *et al.*, 2004; Jacobson *et al.*, 2003), a presença simpátrica de múltiplas espécies de *Leishmania* (Brito *et al.* 2009; Tojal da Silva *et al.*, 2006; Sharma *et al.* 2005; Al-Jawabreh *et al.*, 2004;), a identificação de novas associações entre vetores e parasitas (Svobodova *et al.*, 2006), e o isolamento de novas linhagens, associadas a LT, ainda não classificadas no gênero *Leishmania* (Villinski *et al.*, 2008; Noyes *et al.*, 2002).

A re-emergência e a propagação da leishmaniose observada por todo o mundo pode ser atribuída a três fatores de risco: variações no ambiente de origem humana, imunossupressão e fracasso no tratamento e resistência a drogas (Dujardin, 2006) . A doença é freqüente em indivíduos que exploram florestas (Lainson & Shaw 1987), embora em alguns casos são comuns em populações suburbanas de grandes cidades. Nesta situação, cães, eqüídeos e/ou roedores são reservatórios secundários, porém fonte importante de infecção de *Leishmania* para flebotomíneos que circulam em ambientes peri- e intradomiciliar (Deane & Grimaldi 1985).

Os parasitas classificados no gênero *Leishmania* têm duas fases distintas em seu ciclo de vida: uma fase promastigota, com flagelo livre, móveis e que vive extracelularmente dentro do tubo digestivo do inseto vetor, e uma fase amastigota, imóvel, com flagelo intracelular e que reside dentro dos macrófagos do hospedeiro vertebrado (Figura 1.2).

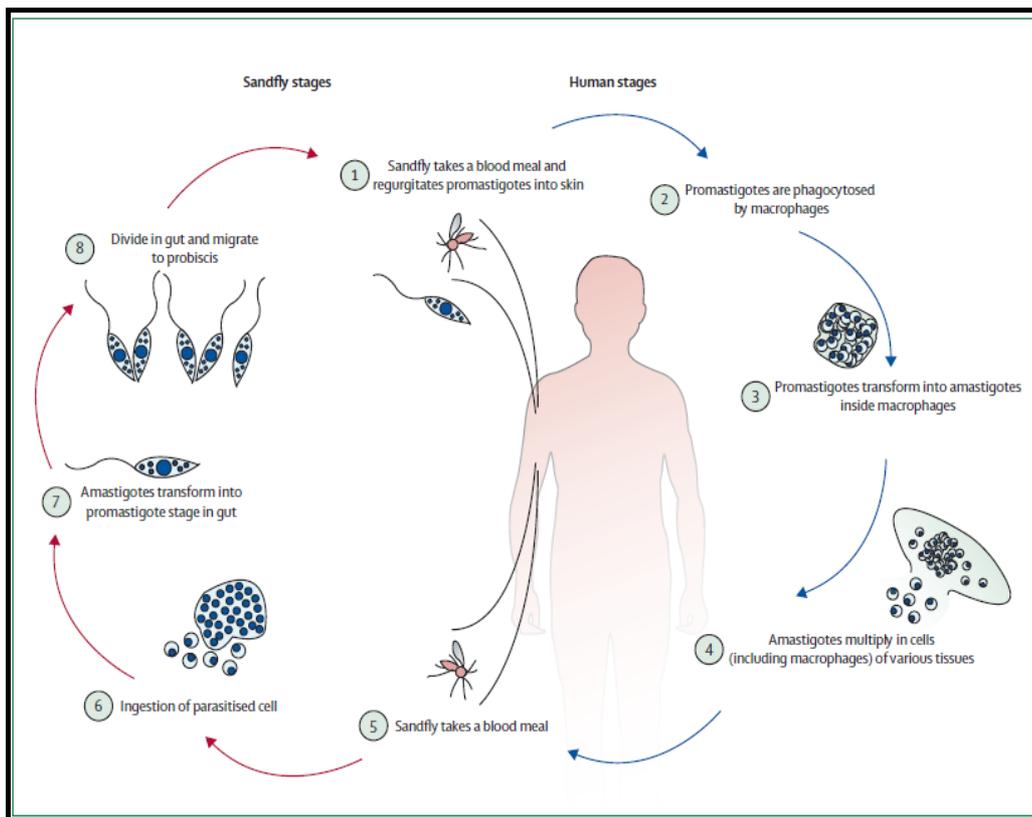


Figura 1.2: Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Fonte: Reithinger *et al.*, 2007

As leishmânias são divididas taxonomicamente em dois subgêneros: *Leishmania (Leishmania)* (Saf'janova 1982), no qual estão classificadas espécies que circulam no Velho Mundo e no Novo Mundo e *Leishmania (Viannia)* (Lainson e Shaw, 1987), representado por espécies encontradas somente no Novo Mundo. Estudos revelam heterogeneidade genética em *Leishmania*. Na última década, várias espécies novas de *Leishmania* foram descritas nas Américas; algumas são patógenos humanos, enquanto outras infectam aparentemente apenas animais silvestres (Cupolillo *et al.* 1994, 1998; Grimaldi *et al.* 1989, 1991; Lainson and Shaw 1987).

No Brasil, até a presente data, sete espécies foram apresentadas estando associadas a LT; são elas: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) shawi* e *L. (L.) amazonensis* (Silveira *et al.* 2002). A maioria está aparentemente limitada a áreas região Norte do país, enquanto *L. braziliensis* e *L. amazonensis* apresentam ampla distribuição pelo

território brasileiro (Manual de Vigilância da LTA, 2010). (Figura 1.3). A *Leishmania infantum* é o principal agente etiológico da LV no Brasil, embora existam alguns relatos de LV associada a outras espécies, como *L. braziliensis* e *L. colombiensis* (Rodríguez-Bonfante *et al.*, 2003; Gontijo *et al.*, 2002; Barral *et al.*, 1991). Atualmente é bastante aceito que *L. infantum* tem como sinóníma a *L. chagasi*, nome este ainda usado para se referir ao agente causal da LV nas Américas, embora a diferença entre estas duas espécies tenha sido vastamente demonstrada (Kuhls *et al.*, 2011).

Em geral, as espécies no subgênero *L. (Viannia)* são responsáveis pela forma mais grave da doença, a leishmaniose mucosa, além de estarem associadas com casos de recaídas (Marsden *et al.*, 1998). A *L. (L.) amazonensis*, embora esteja associada com formas brandas da doença, é responsável pela forma difusa, caracterizada pela deficiência na resposta imunológica (Bomfim *et al.*, 1996). Duas espécies são bastante relevantes na epidemiologia das leishmanioses no Brasil: (i) *L. (V.) braziliensis*, é o principal agente etiológico da leishmaniose cutânea e está amplamente distribuída no país, associada a diferentes ecótopos e ciclos de transmissão; (ii) *L. (V.) guyanensis*, embora praticamente restrita ao norte da bacia Amazônica, é a espécie mais prevalente nesta região, onde são registrados aproximadamente 90% dos casos de LT no país. Estas duas espécies tem sido associadas a LM (Guerra *et al.*, 2011) e apresentam diferenças quanto a resposta ao tratamento (Arevalo *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2001_a).

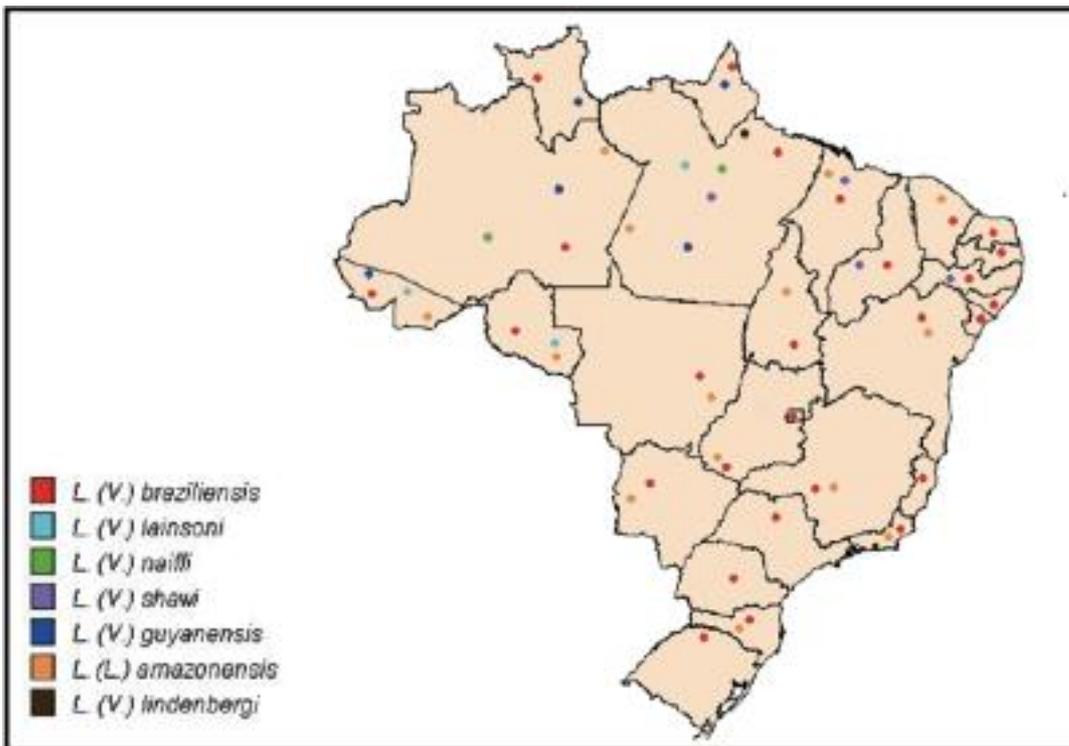


Figura 1.3: Distribuição de espécies de *Leishmania* agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar no Brasil – 2005.

Fonte: SVS/MS

1.2. Leishmaniose: aspectos clínicos e diagnóstico

A leishmaniose tegumentar (LT) possui uma variedade de formas, que são comumente referidas pelas suas características clínicas e patológicas (Murray *et al* 2005). Classicamente esta doença se manifesta sob duas formas: leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa, ou mucocutânea (LM) (Grimaldi & Tesh 1993). É importante mencionar que em alguns casos a infecção é inaparente, ou seja, sem manifestação clínica. Nestes casos, o diagnóstico da infecção é determinado pelos resultados positivos de testes imunológicos, como a intradermoreação de Montenegro (IDRM). Embora o tratamento não seja indicado para estes indivíduos por não se conhecer a evolução desta infecção, a vigilância é fundamental. A leishmaniose linfonodal também deve ser considerada como uma manifestação clínica da LT.

As lesões que caracterizam a LC tem apresentações clínicas diversas, que incluem desde úlceras típicas, com formato arredondado, bordas bem definidas, fundo avermelhado e que, em geral, apresentam infecções bacterianas secundárias,

até lesões menos frequentes, que podem ser nodulares, profundas, paulares, papilomatosas ou verrucosas. Essa diversidade de aspectos clínicos certamente pode promover uma dificuldade no diagnóstico da LC (Oliveira Neto, 1998). As lesões cutâneas podem evoluir para cura espontânea, o que provavelmente depende da resposta imune do hospedeiro e da espécie do parasita envolvida na infecção. Geralmente as seguintes formas clínicas são descritas para a LC: (i) Forma cutânea localizada, geralmente com lesão tipo úlcera, com tendência a cura espontânea e IDRM positiva; (ii) forma cutânea disseminada, representando uma forma relativamente rara (cerca de 2% dos casos), causadas principalmente pela *L. braziliensis*, com acometimento mucoso, escassez de parasitas nas lesões, títulos elevados de anticorpos séricos e IDRM nem sempre positivo; (iii) forma difusa, cuja etiologia está associada a espécies do complexo *L. mexicana* (no Brasil a *L. amazonensis*), caracterizada principalmente pela anergia, deficiência na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*, má resposta terapêutica e IDRM geralmente negativa; (iv) recidiva cútis, que caracteriza-se por uma evolução clínica satisfatória, com cura espontânea ou boa resposta terapêutica, mas com reativação da lesão. (Figura 1.4).

Clinicamente, a LM se expressa por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores (Murray *et al.*, 2005). Geralmente a infecção da mucosa aparece após a lesão cutânea, por disseminação hematogênica ou linfática. A maioria dos pacientes com LM apresenta cicatriz indicativa de LC anterior, mas também pode-se observar pacientes com lesões cutânea e mucosa concomitantemente. Esta forma da doença caracteriza-se por apresentar IDRM fortemente positiva, escassez parasitária nos tecidos lesionados e difícil resposta terapêutica. Cerca de 3 a 5% dos casos de LC evoluem para LM, fenômeno mais prevalente em áreas de circulação de *L. braziliensis*, no entanto, a LM também pode estar associada a outras espécies de *Leishmania*; sabe-se que na região Norte do Brasil *L. guyanensis* também é um importante agente causal da LM (Guerra *et al.*., 2011).



Figura 1.4: Diversidade de manifestações clínicas observadas na leishmaniose tegumentar. A- Lesão cutânea localizada, B- Lesão muco-cutânea e C- forma cutânea difusa.

Fonte: A-<http://tripweb.wordpress.com/2009/08/21/leishmaniose-cutanea-em-crianca/>, B-http://www.medicinanet.com.br/conteudos/biblioteca/2515/5_associacao_da_leishmaniose_tegumentar_americana_a_outras_doencas.htm, C-<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html>.

A infecção por espécies de *Leishmania* do complexo *L. donovani*, classicamente conhecido como o complexo de espécies associado a LV, pode resultar também em um espectro clínico diverso, incluindo manifestações clínicas discretas (oligossintomáticas), moderadas e graves e que se não tratadas podem levar o paciente a morte. A infecção assintomática por estas espécies parece ser um evento comum em áreas endêmicas de LV (Michel *et al.*, 2011). Febre e esplenomegalia associados ou não a hepatomegalia são os principais sintomas que levam a suspeita de um diagnóstico clínico de LV. É altamente recomendado que o

diagnóstico e tratamento da LV seja feito precocemente. Este deve ser complementado pelo diagnóstico sorológico e parasitológico, sempre que possível.

Embora o diagnóstico das leishmanioses possa ser feito com base em dados clínicos e epidemiológicos, este deve ser confirmado por testes parasitológicos, imunológicos, histopatológicos e, eventualmente, pela prova terapêutica. Considerando a semelhança com sintomas que também são observados em outras doenças que são frequentes nas áreas endêmicas de leishmaniose, como hanseníase, câncer de pele, esporotricose, tuberculose, no caso de LC, e malária e esquistossomose, no caso de LV, o diagnóstico diferencial é bastante importante, sendo indicada a confirmação do diagnóstico por métodos parasitológicos. O achado da *Leishmania* em tecido do hospedeiro e/ou o isolamento do parasita em meio de cultura ainda são utilizados como principal parâmetro para o diagnóstico parasitológico. O diagnóstico parasitológico permanece como sendo o padrão ouro no diagnóstico de leishmaniose por causa de sua alta especificidade (Herwaldt *et al.*, 1999).

O diagnóstico parasitológico de leishmaniose tegumentar americana (LTA) é baseado em aposição de fragmentos de tecidos, retirados das lesões suspeitas de serem leishmaniose, em lâminas para a observação direta do parasito e/ou isolamento e cultivo dos parasitas. Além disso, teste imunológico, no caso a IDRM, também é utilizado para o diagnóstico da LT (Manual de Vigilância da LTA, 2010). Métodos moleculares, baseados na PCR, vem assumindo um importante papel para o diagnóstico desta doença (Reithinger and Dujardin 2007), assunto que será abordado abaixo. Como já constatado, o local de coleta do fragmento de tecido na lesão da LT influi consideravelmente no resultado, mesmo utilizando uma técnica tão sensível quanto a PCR.

O diagnóstico parasitológico da LV também é feito através de encontro do parasita nos exames parasitológicos diretos, examinando material obtido principalmente de punção de medula e linfonodo. O isolamento e cultivo do parasita em meio de cultura também é utilizado como método de diagnóstico da LV. No caso da LV, os exames laboratoriais complementares são bastante indicados, considerando que esta doença esta associada a algumas alterações como anemia, trombocitopenia, alterações bioquímicas diversas, entre outras. Os testes

sorológicos também têm uma grande importância no diagnóstico da LV, como a imunofluorescência indireta (IFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a IDRM. No entanto, os resultados só podem ser analisados quando comparados com o quadro clínico, pois podem variar em função do estágio da doença (Alvar *et al.*, 1997).

Distinguir a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção é crucial para um correto diagnóstico e prognóstico da doença. O conhecimento das diferenças observadas na virulência ou resposta aos agentes quimioterápicos entre as espécies de *Leishmania* são de grande valia para definir estratégias que envolvam medidas de tratamento e controle da doença (Arevalo *et al.*, 2007). Entretanto, por conta das semelhanças morfológicas entre as diferentes espécies causadoras das leishmanioses, as avaliações parasitológicas não distinguem entre as espécies causadoras da doença (Romero *et al.* 2001_b; Aviles *et al.* 1999; Wilson *et al.* 1995; Weigle *et al.* 1986). Da mesma forma, os testes imunológicos mencionados acima, embora úteis para o diagnóstico das leishmanioses, também não distinguem entre as espécies de *Leishmania*.

Métodos imunológicos, bioquímicos, histopatológicos e moleculares (Botilde *et al.*, 2006; Rotureau *et al.*, 2006; Cupolillo *et al.*, 1995; Grimaldi *et al.*, 1991; Ashford *et al.*, 1991) têm ajudado na identificação e classificação destes parasitos, sendo os mais utilizados a eletroforese de enzimas - MLEE (Rioux *et al.*, 1990), que é considerado padrão ouro. É importante mencionar que este método, assim como muitos outros utilizados na identificação de espécies, dependem do isolamento prévio do parasita, assim como da possibilidade de cultivo. O isolamento dos parasitos nem sempre é fácil, pela frequência de infecções secundárias.

Resumindo, o exame parasitológico por microscopia é provavelmente ainda a abordagem padrão de diagnóstico em níveis terciários, secundários ou primários de saúde, porque as técnicas mais sofisticadas são caras e raramente disponíveis. O isolamento e cultivo combinados com MLEE permite a identificação e caracterização da espécie do parasita. No entanto, esta abordagem exige uma riqueza de conhecimentos técnicos e é demorada, e os resultados são potencialmente tendenciosos por causa do isolamento. A sensibilidade da microscopia e da cultura tende a ser baixa e pode ser altamente variável (Herwaldt, 1999), dependendo do número e dispersão de parasitas no fragmento de tecido coletado, do procedimento de amostragem e, também, da capacidade técnica da equipe.

Assim como para inúmeras outras doenças infecciosas, técnicas baseadas na PCR (“Polymerase Chain Reaction”), tem sido desenvolvidas e avaliadas quanto ao potencial para o diagnóstico das leishmanioses. Desde a primeira descrição da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de espécies de *Leishmania* (Rodgers *et al.*, 1990), vários estudos têm demonstrado a importância desta técnica no diagnóstico etiológico das diferentes formas das leishmanioses. Em função da complexidade da doença, com associação a diversas espécies do parasita, tem sido dada ênfase no desenvolvimento e avaliação de métodos que permitam o diagnóstico molecular associado à possibilidade de identificação específica do agente etiológico. Ensaios de PCR direcionados para a amplificação da região conservada dos minicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA) e para a subunidade menor (SSU) do gene ribossomal (rDNA) têm se mostrado os mais sensíveis, mas estes só permitem a identificação em nível de gêneros e/ou subgêneros (Bensoussan *et al.*, 2006; Disch *et al.*, 2005; Schönian *et al.*, 2003; Lachaud *et al.*, 2002; Van Eys *et al.*, 1992). Diferentes alvos tem sido propostos visando o diagnóstico com identificação do agente etiológico em nível específico. Dentre estes destacamos o uso de sequências repetitivas do DNA nuclear (Piarroux *et al.* 1993), o gene de mini-exon (Harris *et al.* 1998), o gene de *gp63* (Victoir *et al.* 1998), os espaçadores internos transcritos (ITS) do rDNA (Schonian *et al.*, 2003), o gene de glucose 6 fosfato (Castilho *et al.*, 2003), de *hsp70* (Fraga *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2004), de citocromo b (Kato *et al.*, 2005) e o gene 7SL RNA (Zelazny *et al.*, 2005). Todos estes foram testados em promastigotes de *Leishmania*, mas também aplicados para detecção direta do parasita em tecidos de animais infectados, humanos ou não, e também em flebotomíneos.

Enquanto ensaios de PCR direcionados para amplificação da região ITS1 do rDNA estão entre os mais usados para o diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania* no Velho Mundo (Schonian *et al.*, 2010), a PCR tendo como alvo a amplificação da região conservada de minicírculos do kDNA tem sido amplamente utilizada no Brasil (Ampuero *et al.*, 2009). A PCR para ITS1 permite a identificação de praticamente todas as espécies de *Leishmania* após a digestão do produto de PCR pela enzima de restrição *HaeIII*, embora a separação de algumas espécies, como a *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, só seja possível a partir da análise das sequências desta região (Schonian *et al.*, 2003). O uso da PCR para o kDNA não tem sido muito explorado quanto a sua capacidade em distinguir espécies,

provavelmente em função da conservação desta região, embora tenha sido reportado a utilidade deste marcador, quando associado ao RFLP (“restriction fragment length polymorphism”), para identificar *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Volpini *et al.*, 2004 e 2006).

Embora existam vários guias descrevendo a validação de métodos analíticos e métodos alternativos (Feldicine *et al.*, 2002), pouco se tem dito a respeito da validação de métodos moleculares, categorizados segundo a “Association of Official Analytical Chemists” (AOC). Sabe-se da dificuldade em padronizar e, conseqüentemente, validar métodos publicados baseados na PCR, para serem utilizados como método alternativo de diagnóstico de uma determinada patologia. Essa dificuldade tem base em fatores como variação no desempenho de termocicladores, eficiência das diferentes polimerases, presença de inibidores na amostra biológica (Hoorfar *et al.*, 2002). Portanto, para que a metodologia utilizada forneça resultados confiáveis é necessário que ensaios de padronização sejam conduzidos e que as metodologias sejam validadas. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (Malorny *et al.*, 2003). Mesmo com um excessivo número de trabalhos empregando a PCR para o diagnóstico das leishmanioses, o uso de métodos “in-house” é o mais freqüente. Poucos trabalhos apresentam resultados de padronização e validação do ensaios de PCR testando a sensibilidade e especificidade não só com DNA extraído de promastigotas em cultura, mas também com DNA extraído de diferentes tipos de material clínico, apresentando ensaios de controle para inibição da reação de PCR e da qualidade de extração do DNA e comparando diferentes metodologias baseadas na PCR (Nasereddin *et al.*, 2008; Bensoussan *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2004; Schönian *et al.*, 2003).

É notório que os protocolos baseados em PCR aumentaram a velocidade e a sensibilidade do diagnóstico espécie-específico da leishmaniose em comparação com as técnicas convencionais, como a microscopia e a cultura do parasita, no entanto mais estudos ainda são necessários, incluindo etapa de padronização e validação para que estes métodos sejam aplicados na rotina do diagnóstico da Leishmaniose.

2.OBJETIVOS

2.1.Objetivo geral

Desenvolver, avaliar e validar métodos moleculares para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar, capazes de identificar os diferentes agentes etiológicos de forma direta (sem necessidade de isolamento e cultivo dos parasitos), utilizando material clínico.

2.2.Objetivos específicos

- 1. Determinar o limite de detecção da PCR para os alvos kDNA, ITS1, g6pd, *hsp70* 1400pb e suas regiões menores (*hsp70A*, *hsp70B*, *hsp70C* e *hsp70D*) utilizando DNA isolado de formas promastigotas de *Leishmania*;**
- 2. Desenvolver uma PCR tendo como alvo a região interna do gene *hsp70*, de maneira a melhorar o percentual de positividade da reação e ainda permitir a discriminação das espécies através do RFLP;**
- 3. Avaliar a capacidade de discriminação das diferentes espécies de *Leishmania* através do sistema PCR-RFLP, empregando os alvos kDNA, ITS1 e *hsp70* (fragmento de 1.400pb e regiões menores) utilizando DNA isolado de cepas referência mantidas em cultura;**
- 4. Validar os resultados de identificação de espécies, obtidos pelos diferentes marcadores, utilizando um painel de 70 cepas de *Leishmania* spp.**
- 5. Validar os resultados de identificação de espécies, obtidos pelos diferentes marcadores, utilizando 99 amostras de tecidos coletados de pacientes diagnosticados com leishmaniose tegumentar.**
- 6. Comparar o percentual de positividade da PCR dos diferentes alvos utilizando DNA isolado de fragmentos de tecido de pacientes diagnosticados com leishmaniose tegumentar;**

3.METODOLOGIA

3.1. Descrição das etapas experimentais

(a) Avaliação do limite de detecção de DNA de promastigotas pelos alvos kDNA, ITS1, *g6p*, *hsp70*, *hsp70A*, *hsp70B*, *hsp70C* e *hsp70D*: DNA extraído de cepas de referência de *Leishmania* spp foram diluídos em várias concentrações e estas utilizadas nos ensaios de PCR para os alvos mencionados;

(b) Avaliação da capacidade dos diferentes métodos de PCR em discriminar espécies de *Leishmania* analisando cepas de referência das espécies patogênicas para humanos que circulam no Brasil: foram realizadas PCR direcionadas para os alvos kDNA, *g6p*, ITS1, *hsp70*, *hsp70A*, *hsp70B*, *hsp70C* e *hsp70D*. Exceto para *g6p*, os produtos de PCR foram digeridos com enzimas de restrição e através da PCR-RFLP foi avaliada a capacidade dos marcadores em discriminar as espécies. No caso de *g6p* a abordagem utilizada foi a descrita em Castilho *et al.*, 2003, que utiliza diferentes combinações de iniciadores para separar os subgêneros; no caso de ser *L. (Viannia)*, podem ser diferenciadas as espécies de *L.braziliensis* das outras;

(c) Avaliação da reprodutibilidade dos resultados obtidos no item acima utilizando um painel de 70 cepas de *Leishmania* representativas das diversas espécies patogênicas ao homem que circulam no Brasil. Todas as cepas foram submetidas aos ensaios de PCR descritos no item anterior;

(d) A avaliação do efeito da concentração de DNA humano na inibição das reações de PCR mKDNA, ITS-1, *hsp70*, *hsp70A* e *hsp70C*: DNA de indivíduo saudável foi extraído e diluído em diversas concentrações; a estes DNAs foi adicionado DNA de promastigotas de *Leishmania* em concentrações diversas. Todas as combinações de concentrações foram utilizadas nos ensaios de PCR mencionados;

(e) Avaliação da sensibilidade dos alvos mKDNA, ITS1 e *hsp70C* em detectar DNA de *Leishmania* em tecido de animais experimentalmente infectados usando DNA extraído de tecido congelado, apostos em lâminas que foram coradas pelo método de Giemsa e apostos em papel de filtro: Hamsters foram infectados com cepas representativas de seis espécies de *Leishmania*; após um determinado período do

inoculo foram feitas biópsias para extração de fragmento de tecido de lesão ou do local do inoculo. Estes fragmentos foram divididos em três partes e foram processados da seguinte forma: tecido congelado, apostos em lâminas que foram coradas pelo método de Giemsa e apostos em papel de filtro. DNA deste material, utilizando os diferentes procedimentos, foi extraído e utilizado nos ensaios de PCR tendo como alvos dos alvos o kDNA, ITS1 e *hsp70C*. As lâminas coradas pelo método de Giemsa foram examinadas para verificação de formas amastigotas (diagnóstico parasitológico);

(f) Avaliação da sensibilidade dos alvos ITS1, *g6p* e *hsp70C* em detectar DNA de *Leishmania* em fragmento de tecido da lesão de pacientes diagnosticados clinicamente com leishmaniose tegumentar: Foram utilizadas 99 amostras obtidas de pacientes clinicamente diagnosticados com LT. Foi extraído DNA destas amostras e nesta etapa foram utilizadas apenas DNA que resultaram em reações positivas pela PCR kDNA;

(g) Avaliação da sensibilidade da PCR ITS1 e *hsp70C* em detectar DNA de *Leishmania* em fragmento de tecido da lesão de pacientes, diagnosticados clinicamente com leishmaniose tegumentar, apostos em lâminas que foram coradas pelo Giemsa: foram utilizados 123 amostras de DNA que já haviam sido extraídos pelo Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do IOC - LIPMED; estes DNAs já haviam sido submetidos a PCR kDNA e os resultados foram todos positivos. Os DNAs foram então submetidos a PCR direcionada para ITS1 e *hsp70C*;

(h) Controles de amplificação

Controles negativos das reações de PCR: Para todos os ensaios de PCR realizados foi incluída uma reação contendo todos os reagentes necessários para a PCR sem a adição de qualquer tipo de DNA.

Controles positivos das reações de PCR: Para todos os ensaios de PCR realizados foi incluída uma reação contendo DNA de promastigota de cepa de referência *Leishmania* que foi determinado previamente como resultando em positividade em qualquer ensaio.

Controle interno das reações: Para avaliar a possibilidade de reações negativas corresponderem a falsos-negativos, para todas as amostras que resultaram em

reações negativas foram realizadas novas reações de PCR e a estas foi adicionado DNA de promastigota de cepa de referência *Leishmania* que foi determinado previamente como resultando em positividade em qualquer ensaio.

(i) Sequenciamento

Os produtos do alvo *hsp70C* para as cepas de referência foram observados em gel de acrilamida 6% e purificados utilizando kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System kit (Promega, USA) e sequenciados utilizando os mesmos primers empregados na reação de PCR. O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático (ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing, USA) utilizando as facilidades da Fiocruz (Genomic Platform – DNA sequencing, PDTIS-FIOCRUZ).

A seguir estão apresentadas as metodologias utilizadas para o cumprimento das diversas etapas descritas acima.

3.2. Seleção das cepas de *Leishmania*, infecção de hamsters (*Mesocricetus auratus*) e diagnóstico parasitológico da infecção.

Todas as cepas de *Leishmania* utilizadas neste trabalho são representativas dos dois subgêneros de *Leishmania* que incluem espécies patogênicas para o homem, *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)*. As cepas utilizadas estão depositadas, sob a forma aberta, na Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC.

Cepas de referência de sete espécies distintas foram utilizadas em todos os ensaios de PCR (no caso, empregando DNA extraído de promastigotas em cultura). São estas: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. naiffi*, *L. shawi* e *L. lainsoni*, *L. amazonensis* e *L. infantum* (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Identificação das cepas de referência utilizadas nos ensaios de PCR, com suas respectivas espécies e zimodemas.

IOC	Código Internacional	Espécie	Zimodema (IOC/Z)
L565	MHOM/BR/1975/M4147	<i>Lg</i>	23
L575	IFLA/BR/1967/PH8	<i>La</i>	07
L579	MHOM/BR/1974/PP75	<i>Li</i>	01
L566	MHOM/BR/1975/M2903	<i>Lb</i>	27
L1023	MHOM/BR/1981/M8426	<i>LI</i>	15
L1545	MCEB/BR/1984/M8408	<i>Ls</i>	26
L1365	MDAS/BR/1979/M5533	<i>L.n</i>	36

MHOM= *Homo sapiens*; MDAS= *Dasyus sp*; MCEB= *Cebus apela*; IFLA= *Lutzomyia flaviscutellata*

BR= Brasil

IOC-Z= classificação em zimodemas determinada pela CLIOC (Cupolillo *et al* 1994)

Lg *L. guyanensis*; *La*, *L. amazonensis*; *Li*, *L. infantum*, *Lb*, *L. braziliensis*; *LI*, *L. lainsoni*; *Ls*, *L. shawi*; *Ln*, *L. naiffi*

Além destas, foram utilizadas 63 cepas representativas das diversas espécies de *Leishmania* que circulam no Brasil e que são patógenos humanos (Tabela 3.2). Estas cepas foram utilizadas nos ensaios de PCR visando avaliar a capacidade dos ensaios em discriminar estas espécies.

Tabela 3.2: Painel de cepas de *Leishmania* com suas respectivas espécies e zimodemas, representativo das diversas espécies patogênicas ao homem que circulam no Brasil, utilizadas nos ensaios de PCR para verificação da capacidade destes em discriminar espécies.

Números	IOC	Código Internacional	Espécie	Zimodema (IOC/Z)
1	L114	MHOM/VE/XXXX/L64	<i>La</i>	07
2	L185	MHOM/BR/1977/LTB0016	<i>La</i>	07
3	L569	MHOM/BR/1982/M69	<i>La</i>	07
4	L615	MHOM/BR/1985/MNB	<i>La</i>	07
5	L930	MHOM/BR/1987/BA-89	<i>La</i>	07
6	L982	MDID/BR/1987/IM3217	<i>La</i>	07
7	L2571	MHOM/BR/2003/NJS	<i>La</i>	07
8	L2565	MHOM/BR/2003/VSV	<i>Li</i>	01
9	L2566	MHOM/BR/2003/MMV	<i>Li</i>	01
10	L2568	MHOM/BR/2003/BN	<i>Li</i>	01
11	L2569	MCAN/BR/2003/HUGER	<i>Li</i>	01
12	L2570	MHOM/BR/2003/VC	<i>Li</i>	01
13	L1731	MAGO/BR/1992/IM154	<i>Lb</i>	53
14	L2152	MHOM/BR/1996/AFN	<i>Lb</i>	27

15	L2419	MHOM/BR/1999/JAS	<i>Lb</i>	73
16	L2420	MHOM/BR/1999/PCS	<i>Lb</i>	74
17	L2427	MHOM/BR/1999/SJB	<i>Lb</i>	74
18	L2491	MHOM/BR/2002/NMT-RBO005	<i>Lb</i>	78
19	L2492	MHOM/BR/2002/NMT-RBO011	<i>Lb</i>	83
20	L2495	MHOM/BR/2002/NMT-RBO025	<i>Lb</i>	78
21	L2498	MHOM/BR/2002/NMT-RBO029	<i>Lb</i>	84
22	L2499	MHOM/BR/2002/NMT-RBO035	<i>Lb</i>	81
23	L2501	MHOM/BR/2002/NMT-RBO037	<i>Lb</i>	79
24	L2194	MHOM/BR/1997/GSL	<i>Lb</i>	27
25	L2195	MHOM/BR/1997/MBS-B	<i>Lb</i>	27
26	L2196	MHOM/BR/1997/JCM	<i>Lb</i>	27
27	L2197	MHOM/BR/1997/NSL	<i>Lb</i>	27
28	L2198	MHOM/BR/1997/EOC	<i>Lb</i>	27
29	L2199	MHOM/BR/1997/SIS	<i>Lb</i>	27
30	L2200	MHOM/BR/1997/VAP	<i>Lb</i>	27
31	L2202	MHOM/BR/1997/JP-2	<i>Lb</i>	27
32	L2203	MHOM/BR/1997/MAS	<i>Lb</i>	27
33	L2237	MHOM/BR/1997/JFM	<i>Lb</i>	27

34	L2251	MHOM/BR/1997/SFS	<i>Lb</i>	27
35	L2254	MHOM/BR/1997/ECF	<i>Lb</i>	27
36	L2501	MHOM/BR/2002/NMT-RBO037	<i>Lb</i>	79
37	L2538	MHOM/BR/2002/EMM	<i>Lb</i>	27
38	L2823	MHOM/BR/2001/RGJ	<i>Lb</i>	27
39	L2824	MHOM/BR/2001/LCAS	<i>Lb</i>	27
40	L2825	MHOM/BR/2002/DAM	<i>Lb</i>	27
41	L2918	MHOM/BR/2006/ICA	<i>Lb</i>	27
42	L3072	MHOM/BR/2008/NC	<i>Lb</i>	27
43	L2502	MHOM/BR/2002/NMT-RBO040	<i>Lb</i>	82
44	L2366	MHOM/BR/1997/NMT-MAO258P	<i>Lg</i>	23
45	L2369	MHOM/BR/1997/NMT-MAO261P	<i>Lg</i>	23
46	L2380	MHOM/BR/1997/NMT-MAO301P	<i>Lg</i>	23
47	L2383	MHOM/BR/1997/NMT-MAO302G	<i>Lg</i>	23
48	L2393	MHOM/BR/1997/NMT-MAO309G	<i>Lg</i>	23
49	L2493	MHOM/BR/2002/NMT-RBO013	<i>Lg</i>	23
50	L1058	MCOE/BR/1983/IM1367	<i>LI</i>	15
51	L2490	MHOM/BR/2002/NMT-RBO004	<i>LI/Ln</i>	87
52	L2496	MHOM/BR/2002/NMT-RBO027G	<i>LI</i>	86

53	L2500	MHOM/BR/2002/NMT-RBO036	<i>Li</i>	86
54	L2503	MHOM/BR/2002/NMT-RBO044	<i>Li</i>	86
55	L992	MDAS/BR/1987/IM3280	<i>Ln</i>	42
56	L993	MDAS/BR/1987/IM3281	<i>Ln</i>	36
57	L995	MDAS/BR/1987/IM3292	<i>Ln</i>	36
58	L1123	MHOM/BR/1986/IM2736	<i>Ln</i>	36
59	L1871	MHOM/BR/1991/IM3740	<i>Ln</i>	36
60	L1953	MHOM/BR/1994/IM4000	<i>Ln</i>	49
61	L1939	ISQU/BR/1994/IM3936	<i>Ln</i>	49
62	L1067	IWHI/BR/1985/IM2324	<i>Ls</i>	26
63	L1069	IWHI/BR/1985/IM2330	<i>Ls</i>	26

MHOM= *Homo sapiens*; MDAS= *Dasyopus sp*; MDID= *Didelphis sp*; MCAN= *Canis familiaris* MAGO= *Agouti paca*; MCOE= *Coendou sp.*; ISQU= *Lutzomyia squamiventris*; IWHI= *Lutzomyia whitmani*

BR= Brasil

IOC-Z= classificação em zimodemas determinada pela CLIOC (Cupolillo *et al* 1994)
La, *L. amazonensis*; *Lb*, *L. braziliensis*; *Lg*, *L. guyanensis*; *Li*, *L. lainsoni*; *Ln*, *L. naiffi*;
Ls, *L. shawi*

Cepas representantes de seis espécies, conhecidas como agentes causais de LT, foram utilizadas na infecção de hamsters (*Mesocricetus auratus*): *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. lainsoni* e *L. amazonensis* (Tabela 3.3) Foi utilizado um animal para cada cepa, ou seja 6 animais foram utilizados nesta etapa, onde o animal foi inoculado na pata traseira esquerda (2×10^7 parasitas por μ l). Todos os isolados já haviam sido identificados por eletroforese de enzimas utilizando protocolo padronizado (Cupolillo *et al.*, 1994). As amostras encontram-se depositadas, sob forma de depósito aberto, na CLIOC.

Tabela 3.3: Identificação de cepas de *Leishmania*, com suas respectivas espécies e zimodemas, utilizadas na infecção de *Mesocricetus auratus* para obtenção de tecidos infectados, extração de DNA e posterior utilização nos ensaios de PCR.

IOC	Código Internacional	Espécie	Zimodema (IOC/Z)
L 185	MHOM/BR/1977/LTB0016	<i>La</i>	7
L 1058	MCOE/BR/1983/IM1367	<i>LI</i>	15
L 1067	IWHI/BR/1985/IM2324	<i>Ls</i>	26
L 1871	MHOM/BR/1991/IM3740	<i>Ln</i>	36
L 2501	MHOM/BR/2002/NMT-RBO037	<i>Lb</i>	79
L 2366	MHOM/BR/1997/NMT- MAO 258P	<i>Lg</i>	23

MHOM= *Homo sapiens*; MCOE= *Coendou sp.*; IWHI= *Lutzomyia whitmani*

BR= Brasil

IOC-Z= classificação em zimodemas determinada pela CLIOC (Cupolillo *et al.*, 1994)

La, *L. amazonensis*; *LI*, *L. lainsoni*; *Ls*, *L. shawi*; *Ln*, *L. naiffi*; *Lb*, *L. braziliensis*; *Lg*, *L. guyanensis*.

As cepas apresentadas nas Tabelas 3.1, 3.2 e 3.3 encontravam-se criopreservadas na CLIOC. Após retirados do nitrogênio líquido, os criotubos contendo as amostras foram colocados em banho-maria a 37⁰C por 5 minutos e em seguida o conteúdo do criotubo, contendo as células em formas promastigotas do parasito, foi transferido para um tubo contendo meio bifásico, ágar sangue como fase sólida - NNN (Novy McNeal Nicole) e, como meio em fase líquida, meio

Schneider (Vitrocell / Embriolife código *00297*), suplementando com Soro Fetal Bovino – SFB (Cultilab, Brasil) a 10%. As amostras foram cultivadas em estufa tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio - BOD a 25⁰C, para proliferação das células viáveis. As culturas foram expandidas em garrafas de cultura de 25 cm² com meio Schneider, incubadas a 25⁰C. No final do terceiro dia de cultivo este material foi centrifugado a 2284 x g, 4⁰C, por 10 minutos. No caso das cepas listadas nas Tabelas 1 e 2, as células foram lavadas com PBS (solução salina tamponada com fosfato – Sigma código P4417-100TAB) e novamente centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e o sedimento congelado a -20⁰ C até o momento de extração do DNA. No caso das cepas listadas na Tabela 3, as células foram ressuspensas, contadas e ajustadas para a concentração de 2 x 10⁷ células em 0.1ml de PBS; este material foi inoculado na pata traseira esquerda de cada hamster (*Mesocricetus auratus*).

Os ensaios de infecção experimental realizados nesta dissertação estavam previstos no projeto “Capacitação da Coleção de *Leishmania* do IOC segundo padrões operacionais para inclusão do seu acervo na rede de Coleções de Recurso Biológicos - CRBs”, licenciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz - CEUA, sob o número L-027/07, com validade até 30 de agosto de 2011.

Após 4 semanas da inoculação (com exceção do animal infectado com *L. shawi*, pois este ficou em observação por 8 semanas e como não foi observada nenhuma lesão, a biópsia foi realizada no local do inóculo), os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e de cada animal infectado foram coletados dois fragmentos de tecido do local de inóculo do parasita, que foi na pata traseira esquerda, com o auxílio de uma lâmina de bisturi e pinça. Um fragmento foi utilizado para aposição em papel de filtro e em lâmina de vidro para microscopia. O outro fragmento foi utilizado para isolamento do parasita e para extração de DNA. A parte utilizada para isolamento foi lavada em solução de penicilina/estreptomicina (Gibco, EUA), em seguida em PBS estéril e colocado em meio bifásico de cultura (NNN e Schneider). O fragmento para extração de DNA, assim como o papel de filtro com a aposição dos tecidos, foram colocados em tubos do tipo “ependorf” de 1.5ml, devidamente identificados, e congelados a -20⁰C até o momento da extração. As lâminas com aposição dos tecidos foram coradas pelo método de Giemsa, para posterior exame parasitológico e extração de DNA.

Para coloração por Giemsa as lâminas foram fixadas com metanol por 2 minutos, em seguida o álcool foi escorrido e, sem lavar ou deixar secar, as lâminas

foram cobertas com aproximadamente 5mL de solução de uso do corante Giemsa (Merck, Germany), que é preparada colocando-se 3 gotas do corante de Giemsa para cada 2ml de água destilada, deixando por 10 minutos; após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e foram colocadas para secar em posição vertical, a temperatura ambiente.

O exame das lâminas foi feito em microscópio ótico (Nikon, ECLIPSE E400) acoplado a câmara (Nikon, DMX 1200F), as lâminas foram examinadas e fotografadas, quando formas amastigotas no interior de macrófagos foram observadas.

3.3. Amostras de pacientes clinicamente diagnosticados com leishmaniose cutânea.

Utilizamos um grupo bastante diversificado de amostras oriundas de diversas partes do país: Acre, Bahia, Mato Grosso, Rio de Janeiro e Rondônia.

Foram utilizados DNA extraído de 99 amostras de fragmentos de tecido de lesões cutâneas, sendo 50 de pacientes do Estado do Acre, 29 do Rio de Janeiro e 20 do Mato Grosso.

Também utilizou-se DNA extraído de papel de filtro com aposição de fragmentos de tecido de lesões cutâneas; neste caso foram 77 amostras todas provenientes de pacientes da Bahia. Este DNA já havia sido submetido a PCR direcionada para o kDNA e 67 foram positivos para esta PCR (Romero *et al.*, 2009) e 25 foram positivas para ITS1 (dados não publicados). Das PCR positivas para kDNA e ITS1 utilizou-se 21 na PCR *hsp70C*.

Foram utilizadas amostras de DNA extraído de lâminas com aposições de tecidos de fragmentos de lesões cutâneas de pacientes clinicamente diagnosticados com LC. Um total de 123 amostras, todas provenientes de pacientes do Estado de Rondônia, foram avaliadas pela PCR ITS1 e PCR *hsp70C*. Estas amostras haviam sido previamente avaliadas por PCR kDNA no LIPMED e todas foram positivas. No presente estudo utilizamos o DNA que já havia sido extraído e avaliado no laboratório mencionado acima.

3.4. Extração de DNA das diversas fontes de material e quantificação de DNA.

A extração de DNA das formas promastigotas de *Leishmania*, fragmentos de tecido congelados e aposições dos tecidos em lâminas posteriormente coradas pelo Giemsa seguiu basicamente o protocolo do fabricante para o kit “Wizard™ Genomic DNA Purification” (código A1125, Promega, USA), com exceção das lâminas oriundas de Rondônia, cujas as extrações foram realizadas no LIPMED utilizando o kit “Illustra blood genomic Prep Mini Spin” (código 28-9042-64, GE Healthcare, USA).

As extrações de DNA de papel de filtro contendo aposição dos tecidos infectados foram realizadas seguindo protocolo previamente descrito (Marques *et al.*, 2001).

Promastigotas de *Leishmania*.

As culturas de promastigotas foram centrifugadas e o sedimento ressuspense em 900 µl de solução de lise celular em tubos do tipo “ependorf” de 1.5ml; os tubos foram agitados delicadamente por 6 vezes e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente, misturando gentilmente por 3 vezes, por inversão dos tubos. Estes foram centrifugados a 15.000g por 1 minuto a temperatura ambiente, descartou-se o todo o sobrenadante e agitou-se vigorosamente, em aparelho do tipo “Vortex” para ressuspender o pellet; adicionou-se então 300 µl de solução de lise nuclear e os tubos foram novamente agitados em aparelho do tipo “Vortex” por 30 segundos; adicionou-se 100 µl de solução de precipitação proteica a cada tubo e agitou-se em aparelho do tipo “Vortex” por 30 segundos; os tubos foram centrifugados a 15.000g por 3 minutos, a temperatura ambiente; o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um novo tubo contendo 300 µl de isopropanol e misturado delicadamente por cerca de 10 minutos; os tubos foram novamente centrifugados a 15.000g, a temperatura ambiente, por 1 minuto; o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 300µl de etanol 70%, a temperatura ambiente; os tubos foram agitados delicadamente, por inversão, e finalmente foram centrifugados a 15.000g, a temperatura ambiente, por 1 minuto; o sobrenadante foi descartado e o etanol residual foi aspirado cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta; os tubos foram deixados por 20 minutos invertidos em papel de filtro para secar o etanol restante, em temperatura ambiente; após este período foi adicionado 100µl de solução de hidratação de DNA; as amostras foram incubadas a 65⁰C por 1 hora e, por último, postas em temperatura de -20⁰C.

Fragmento de tecidos

Os fragmentos de tecidos congelados foram cortados com auxílio de lâminas de bisturi para obtenção de pedaços menores e em seguida foram colocados em tubos do tipo “eppendorf” contendo uma solução de 120µl de EDTA 0.5M, pH 8.0, 500 µl da solução de lise nuclear (fornecida com o kit utilizado) e 17,5 µl de Proteínase K 20mg/ml, mantida em gelo. Os tubos foram incubados a 55⁰C, por um período de pelo menos 3 horas, mas podendo ficar um período maior. Nas três primeiras horas os tubos foram agitados em aparelho do tipo “Vortex” a cada 1 hora, verificando se a amostra foi completamente digerida; após esta incubação, foi adicionado 200µl da solução de precipitação proteica e os tubos foram novamente agitados em aparelho do tipo “Vortex” por 20 segundos; os tubos foram mantidos no gelo por 5 minutos e posteriormente centrifugados a 16.000g, a temperatura ambiente, por 4 minutos; o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 600 µl de isopropanol e os passos seguintes desta metodologia já foram descritos no item anterior.

Lâminas.

As lâminas foram raspadas no local onde o tecido foi fixado e corado. O pó obtido pela raspagem foi colocado em tubos do tipo “eppendorf” de 1.5ml e ressuspendido em 90µl de solução de lise celular, misturando delicadamente por 6 vezes, por inversão dos tubos; estes foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente, misturando gentilmente por 3 vezes, por inversão dos tubos, e posteriormente centrifugados a 15.000g por 20 segundos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 20µl de solução de lise nuclear, misturando com o auxílio da pipeta; os tubos foram agitados em aparelho do tipo “Vortex” por 30 segundos e então adicionou-se 7µl de solução de precipitação proteica, agitando os tubos por 30 segundos; após esta etapa os tubos foram centrifugados a 15.000g por 3 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 20µl de isopropanol, misturando delicadamente por cerca de 10 minutos; os tubos foram centrifugados novamente a 15.000g, a temperatura ambiente, por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 20 µl de etanol 70%, a temperatura ambiente; os tubos foram centrifugados novamente a 15.000g, a temperatura ambiente, por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e seguiu-se os mesmos passos descritos no item anterior. Ao final foram adicionados 10µl de solução de hidratação de DNA, as

amostras foram incubadas a 65^oC por 1 hora e, finalmente, postas em temperatura de -20^oC.

Aposições em Papel filtro.

Um pedaço do papel de filtro contendo a aposição de tecido infectado foi coletado e colocado em um tubo do tipo “ependorf” de 1.5ml e em seguida foi adicionado 40µl de água destilada; as amostras foram fervidas a 70^oC por 10 minutos e em seguida centrifugadas a 10.000g por 5 minutos. As amostras foram guardadas a temperatura de -20^oC.

Sangue.

A coleta de sangue foi feita em tubo vacutainer contendo ácido etilenodiaminotetracético - EDTA, através de punção a vácuo, em um único indivíduo saudável. Foi transferido 300 µl de sangue total para um tubo do tipo “ependorf” de 1.5ml. A este tubo foi adicionado 900 µl de solução de lise celular. Os passos seguintes foram os mesmos já descritos para extração de DNA de cultura de promastigotas e para fragmento de tecidos.

Após a extração de DNA todas as amostras foram quantificadas por medida de absorbância, em aparelho específico - NanoDrop ND1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington –DE,EUA) – seguindo as instruções de uso do equipamento.

3.5. Mistura artificial de DNA humano e promastigota.

O DNA extraído de sangue de um único indivíduo saudável, conforme descrito acima, também foi quantificado em aparelho NanoDrop. Após a quantificação o DNA foi diluído em três concentrações distintas: 200ng/µl, 20ng/µl e 200pg/µl. Estas amostras foram misturadas com DNA de promastigotas de *Leishmania* em diversas concentrações: 200ng/µl, 20ng/µl, 2ng/µl, 200pg/µl, 20pg/µl, 2pg/µl, 200fg/µl, 20fg/µl, 2fg/µl, previamente quantificados e diluídos. Portanto, foram obtidas 27 soluções contendo DNA humano e DNA de promastigotas em concentrações distintas.

3.6. Reações de PCR empregadas .

A PCR direcionada para amplificação da região conservada do minicírculo de kDNA foi realizada como padrão-ouro, considerando a alta sensibilidade desta metodologia. Os iniciadores utilizados foram: (150)F 5'GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3', (152)R 5' GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC 3', (153)R 5' CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC 3'. As condições das reações de PCR e do ciclo de amplificação estão apresentadas na Tabela 3.4 e Tabela 3.5, respectivamente (Volpini *et al.*,2004).

A PCR que teve como alvo o gene que codifica para a enzima *g6p* (glucose 6 fosfato desidrogenase) utilizou iniciadores e protocolos previamente descritos (Tojal da Silva *et al.*, 2006; Castilho *et al.*, 2003). No caso desta PCR foram utilizados seis iniciadores em quatro combinações distintas, que aqui foram denominados de *g6pA*, *g6pB*, *g6pC* e *g6pD* e permitiram a seguinte distinção: (A) ISLA + F2, *L. (Leishmania)*; (B) ISVA + ISVC, *L. (Viannia)*; (C) ISVC + ISVB, *L. braziliensis*; (D) ISVC + ISCNB, espécies do subgênero *L. (Viannia)* que não *L. braziliensis* (Tabela 3.6). As condições do ciclo de amplificação e das reações de PCR estão apresentadas na Tabela 3.5 e Tabela 3.7, respectivamente.

As reações de PCR para amplificação do ITS1rDNA (Internal Transcribed Spacer) usaram as seguintes seqüências de iniciadores: LITSR 5' CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3' e L5.8S 5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3'. As condições das reações de PCR e do ciclo de amplificação estão apresentadas na Tabela 3.4 e Tabela 3.5, respectivamente.

Cinco pares de iniciadores foram utilizados para amplificação de seqüência do gene *hsp70* (Heat Shock Protein). O primeiro par de iniciador foi desenhado para amplificar um fragmento 1.400pb, sendo estes *hsp70F* 5' GAC GGT GCC TGC CTA CTT CAA 3' e *hsp70R* 5' CCG CCC ATG CTC TGG TAC ATC 3'. Esta PCR seguiu protocolos previamente descritos (da Silva *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2004) e será referida como *hsp70*. Os demais foram desenhados visando a amplificação de fragmentos menores, contidos nesta região de 1.400pb (Figura 3.1). Estes iniciadores foram desenhados no presente trabalho, através da análise das seqüências desse gene disponíveis no GeneBank¹ e que foram obtidas em trabalho prévio do nosso grupo (da Silva *et al.*, 2010). Os iniciadores foram desenhados utilizando a ferramenta Primer-BLAST disponível na página do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Foram desenhados sete iniciadores distintos ("Fowards": *hsp70F1*, *hsp70F2*, *hsp70F3* e *hsp70F4* e "Reverses": *hsp70R1*,

hsp70R2 e *hsp70R3*) e estes foram combinados a fim de obter a amplificação de quatro fragmentos distintos: *hsp70A*, *hsp70B*, *hsp70C* e *hsp70D* (Figura 3.1). As condições das reações de PCR e do ciclo de amplificação estão apresentadas na Tabela 3.4 e Tabela 3.5, respectivamente.

1

¹ Número de acesso GenBank: GU071172.1 – GU071188.1

Tabela 3.4: Descrição dos protocolos utilizados para as diferentes reações de PCR visando a amplificação dos alvos kDNA, ITS-1 e *hsp70*.

Reagente	kDNA	ITS-1	<i>hsp70</i>^a	Unidade
“Beads”^b	1	--	--	U
Tampão^c	--	1	1	X
dNTP	--	200	200	μM
MgCl²	--	1,50	1,50	mM
150F	0,5	--	--	μM
152R	0,5	--	--	μM
153R	0,5	--	--	μM
LitsR	--	0,20	--	μM
L5.8S	--	0,20	--	μM
<i>hsp70F</i>	--	--	20	pmol
<i>hsp70R</i>	--	--	20	pmol
Taq^c	--	1,5	1	U
DMSO^d	--	--	5	%
DNA	200	200	200	pg
Volume final	25	25	25	μl

^a*hsp70*, *hsp70A*, *hsp70B*, *hsp70C* e *hsp70D*

^bGE HealthCare código 27-9558-01,USA (PuriTaq™ Ready-to-go™ PCR beads)

^cGoTaq® DNA polymerase (M3005 – Promega,USA) 200^dDimethyl Sulfoxide-DMSO (D5879 – Sigma,USA)

Tabela 3.5: Condições de temperatura, tempo e ciclos utilizadas para a amplificação dos alvos kDNA, ITS1, *hsp70* e *g6p*.

		CICLOS				
	PCR	1	2		3	
Temperatura/ Tempo	kDNA	95°C / 5'	94°C / 30"	58°C / 30"	72°C / 10"	72°C / 8'
	ITS1	94°C / 4'	94°C / 30"	53°C / 30"	72°C / 40"	72°C / 8'
	<i>hsp70</i>*	94°C / 5'	94°C / 30"	61°C / 1'	72°C / 3'	72°C / 8'
	<i>g6pA</i>	94°C / 4'	94°C / 30"	65°C / 1'	72°C / 30"	72°C / 8'
	<i>g6pB</i>	94°C / 4'	94°C / 30"	60°C / 1'	72°C / 30"	72°C / 8'
	<i>g6pC</i>	94°C / 4'	94°C / 30"	60°C / 1'	72°C / 30"	72°C / 8'
	<i>g6pD</i>	94°C / 4'	94°C / 30"	62°C / 1'	72°C / 30"	72°C / 8'
Número de ciclos	kDNA	1	30		1	
	ITS1	1	35		1	
	<i>hsp70</i>*	1	33		1	
	<i>g6p</i>**	1	30		1	

*as condições foram as mesmas para *hsp70*, *hsp70A*, *hsp70B*, *hsp70C* e *hsp70D*.

**o número de ciclos não variou entre as PCR direcionadas para o gene *g6p*.

'minutos; "segundos

Tabela 3.6: Sequencias dos iniciadores utilizadas para amplificação do gene *g6p*.

iniciadores <i>g6p</i>	Sequencias
F2	5'- CGGTTGGCGAAGCGTGTC – 3'
ISVA	5'- GTCGGTTATCCTATTCGGGTC – 3'
ISVC	5'- ATCACAATGATGGTCAACGCAC – 3'
ISLA	5'- CTCATCTTATTCACCCACCC – 3'
ISVB	5'- TACTCGCCATGTCGGAGG – 3'
ISVNB	5'- TACTCGCCATGTCGTGTCG – 3'

Tabela 3.7: Protocolos utilizados nas reações de PCR para amplificação do gene *g6p* usando as diferentes combinações de iniciadores.

Reagente	<i>g6pA</i>	<i>g6pB</i>	<i>g6pC</i>	<i>g6pD</i>	Unidade
<i>Tampão</i>^a	1	1	1	1	X
<i>dNTP</i>	200	200	200	200	μM
<i>MgCl</i>²	2	2	2	2	mM
<i>ISVC</i>	--	50	10	10	pmol / μM / μM
<i>ISVA</i>	--	10	--	--	pmol
<i>ISVB</i>	--	--	10	--	μM
<i>ISVNB</i>	--	--	--	10	μM
<i>ISLA</i>	10	--	--	--	μM
<i>F2</i>	10	--	--	--	pmol
<i>Taq</i>^a	1	2	1	1	U
<i>DNA</i>	20	20	20	20	ng
<i>Volume final</i>	25	25	25	25	μl

^aGoTaq® DNA polymerase (M3005 – Promega)



Figura 3.1: Esquema apresentando as regiões internas do gene *hsp70* amplificadas considerando uma sequência de 1.400bp. Também estão apresentadas as sequências e algumas características dos iniciadores utilizados para amplificação de cada região e o tamanho do produto esperado.

Após os ciclos de amplificação, uma alíquota (sempre correspondendo a um volume igual a 10% do volume final) das reações de PCR foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% que deve ser preparado em uma proveta adicionando-se 10ml de poliacrilamida a 6%, 125µl de Persulfato de Amônio a 10% e 12,5µl Tetramethylethylenediamine – TEMED. Esta solução foi aplicada no suporte da cuba de eletroforese Mini-Protean®II (BIO-RAD) e o gel foi submetido a uma corrente elétrica de 100V por 30 minutos; após a corrida a revelação das bandas foi feita em banho em solução de brometo de etídeo (HS041, Molecular Biology Grade, USA) a 5% por 5 minutos.

3.7. Sequenciamento

As cepas de referência de *Leishmania* utilizadas neste trabalho (Tabela 3.1) foram amplificadas com as sequências de iniciadores correspondentes a região aqui denominada de *hsp70C* para posterior sequenciamento do produto de PCR obtido. O produto foi purificado empregando o kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Código A9282, Promega, USA), seguindo as instruções do fabricante, usando 45µl (2 reações de PCR) do produto amplificado. O produto purificado foi estocado a -20°C.

Após a purificação o DNA foi quantificado em aparelho NanoDrop, a concentração de DNA utilizado no seqüenciamento pode variar de 3 a 10ng por µl, em nossas amostras a placa foi preparada contendo 1,5 µl de DNA purificado equivalente a 7,5ng de DNA , 2,4 µl de iniciador, completou-se com H₂O ate o volume de 7,5 µl e a partir daí as amostras foram processadas pelo seqüenciador automático ABI3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems), junto a Plataforma de Genômica – seqüenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ.

O programa Bioedit (*Biological sequence alignment editor for Win95/98/NT/2K/XP*, www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit) foi utilizado para editar e analisar as seqüências das amostras; em seguida foi utilizada a ferramenta de BLAST do NCBI para a confirmação da identidade das espécies analisadas. Os polimorfismos detectados entre as seqüências obtidas foram determinados empregando o programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 4, Tamura *et al.*, 2007, www.megasoftware.net).

3.8. RFLP (“Restriction fragment length polymorphism”) dos produtos de PCR

Os produtos de PCR referentes a amplificação de kDNA, ITS1 e *hsp70* foram submetidos a digestão por enzimas de restrição. As enzimas *ApaLI*, *TaqI*, *BstUI*, *HaeIII* e *AvaI* foram utilizadas para a digestão do produto de kDNA amplificado para as cepas de referência. A partir destes resultados foram selecionadas as enzimas *HaeIII*, *TaqI* e *BstUI* para a digestão dos demais produtos amplificados correspondendo a este alvo. A enzima *Sau3AI* foi utilizada para digestão do produto referente a região ITS1 considerando resultados prévios do nosso grupo (dados não publicados). No caso dos produtos referentes as amplificações direcionadas para *hsp70*, as enzimas utilizadas foram escolhidas com base em resultados prévios do nosso grupo (da Silva *et al.*, 2010) e estas foram *HaeIII* e *BstUI*. Os produtos de amplificação obtidos para *hsp70A*, *hsp70B*, *hsp70C* e *hsp70D*, para as cepas de referência, foram submetidos a digestão pelas enzimas *HaeIII*, *MboI*, *Bccl*, *RsaI*, *AvaI*, *Bstul*, *KpnI* e *SphI*. A partir dos resultados obtidos, somente as enzimas de restrição *HaeIII* e *Bstul* foram utilizadas na digestão dos produtos amplificados, tendo como alvo *hsp70C*, a partir de DNA extraído das demais fontes.

Para as reações de digestão pelas enzimas de restrição, um volume de 3-7 µl do produto amplificado, determinado após a visualização deste em gel de acrilamida como já descrito e corado com prata através do Kit DNA Silver Staining (Código 17-6000-, Healthcare, USA) foi utilizado em reações de 10µl, contendo 1U de enzima, 1µl de solução-tampão específica para cada enzima e água destilada para completar o volume da reação. Estas reações foram realizadas seguindo as recomendações do fabricante. Todas as enzimas utilizadas neste estudo foram da “New England BioLabs”.

3.9. Análise estatística

Foi determinado o total de amostras clínicas positivas empregando cálculo de percentagem, avaliando os resultados obtidos pelos diferentes marcadores moleculares avaliados neste estudo para a detecção de DNA de *Leishmania*.

O índice Kappa foi utilizado para determinar a concordância entre os diversos resultados obtidos, analisando os resultados positivos e negativos obtidos para os marcadores moleculares avaliados nesta estudo: kDNA, ITS1, *g6p*, *hsp70* (1400bp) e *hsp70C*. O cálculo foi realizado empregando o programa disponível no [site www.lee.dante.br/pesquisa/kappa/index.html](http://www.lee.dante.br/pesquisa/kappa/index.html).

4.RESULTADOS

4.1. Limite de detecção e capacidade de discriminação de espécies de todos os alvos utilizados empregando DNA de promastigota.

A primeira etapa deste estudo foi avaliar o limite de detecção de cada alvo escolhido: kDNA, *g6p*, ITS1 e *hsp70*, usando todas as combinações de iniciadores descritas na seção anterior. Para isso, trabalhamos com DNA extraído de promastigotas das sete cepas de referência descritas na Tabela 3.1. O DNA extraído de promastigotas foi diluído em 9 concentrações distintas: 200ng/μl, 20ng/μl, 2ng/μl, 200pg/μl, 20pg/μl, 2pg/μl, 200fg/μl, 20fg/μl e 2fg/μl.

A amplificação tendo como alvo o kDNA foi positiva em todos os ensaios realizados. Logo, este alvo apresentou um limite de detecção de 2fg. No caso de ITS-1 e de *hsp70*, usando os pares de iniciadores que amplificam para região de 1.400pb, o limite de detecção observado foi de 20pg (Figura 4.1), enquanto que a PCR direcionada para a amplificação do gene *g6p* foi capaz de amplificar até 200pg de DNA de *Leishmania* (dados não mostrados).

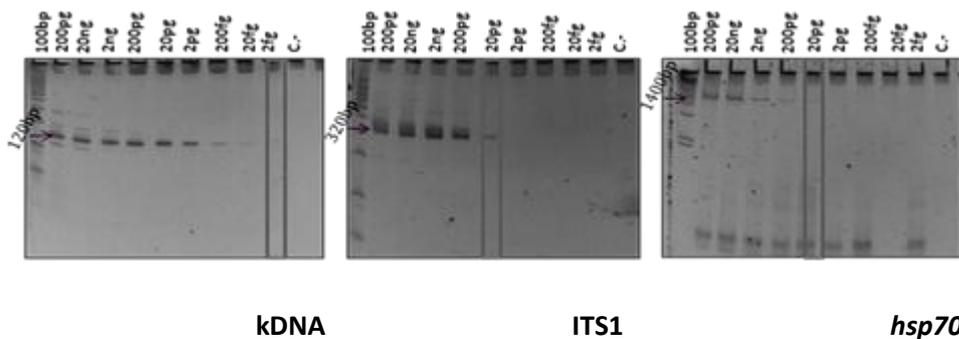


Figura 4.1: Produto da amplificação por PCR direcionadas para os alvos kDNA, ITS-1 e *hsp70* (1.400pb) empregando DNA de promastigotas de *Leishmania guyanensis* em diferentes concentrações. Gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídeo e visualizado por luz ultravioleta. As setas indicam o tamanho (em pares de base) do produto amplificado para cada alvo. 100bp= marcador de peso molecular de 100 pares de base.

O limite de detecção das PCRs realizadas para amplificação de fragmentos menores do gene de *hsp70* também foi avaliado. Neste caso todas as combinações de iniciadores utilizadas foram capazes de amplificar até 2fg de DNA de *Leishmania* (Figura 4.2).

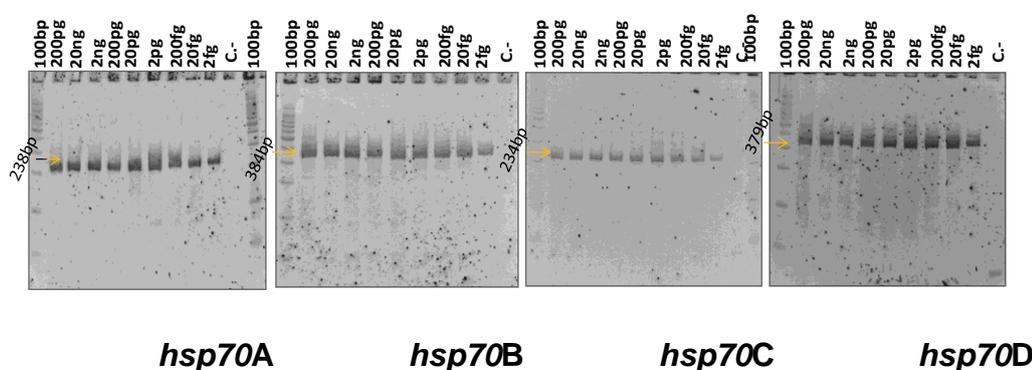


Figura 4.2: Produto da amplificação por PCR direcionadas para os alvos *hsp70A*, *hsp70B*, *hsp70 C* e *hsp70D* empregando DNA de promastigotas de *Leishmania braziliensis* em diferentes concentrações. Gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídeo e visualizado por luz ultravioleta. As setas indicam o tamanho (em pares de base) do produto amplificado para cada alvo. 100bp= marcador de peso molecular de 100 pares de base.

Utilizamos os produtos amplificados para os diversos alvos testados para avaliar a capacidade destes em discriminar entre as espécies de *Leishmania*. Observamos que a digestão dos produtos amplificados para o kDNA não permitiu a discriminação de *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. shawi*. Um perfil distinto foi observado para *L. naiffi* com as enzimas *TaqI* e *BstUI* (Figura 4.3). Embora *L. guyanensis* tenha apresentado um perfil diferente de *L. braziliensis* e *L. shawi* para a enzima *BstUI*, este perfil não se repetiu quando outras cepas desta espécie foram utilizadas (Tabela 4.1). Por isso, algumas cepas listadas na Tabela 4.1 aparecem identificadas como Lb/Lg/Ls, já que não foi possível distinguir entre estas três espécies usando o perfil de restrição da região conservada do minicírculo do kDNA com as enzimas de restrição empregadas. As espécies *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. lainsoni* podem ser distinguidas através da PCR-RFLP do kDNA (Figura 4.3). Considerando a capacidade deste marcador em discriminar as espécies estudadas, observamos correlação com a identificação obtida por MLEE, ou seja, cepas

identificadas como *L. braziliensis* ou *L. guyanensis* ou *L. shawi* apresentaram o mesmo perfil e as cepas previamente identificadas como *L. naiffi*, *L. lainsoni*, *L. amazonensis* e *L. infantum* apresentam perfil característico destas espécies (Tabela 4.1).

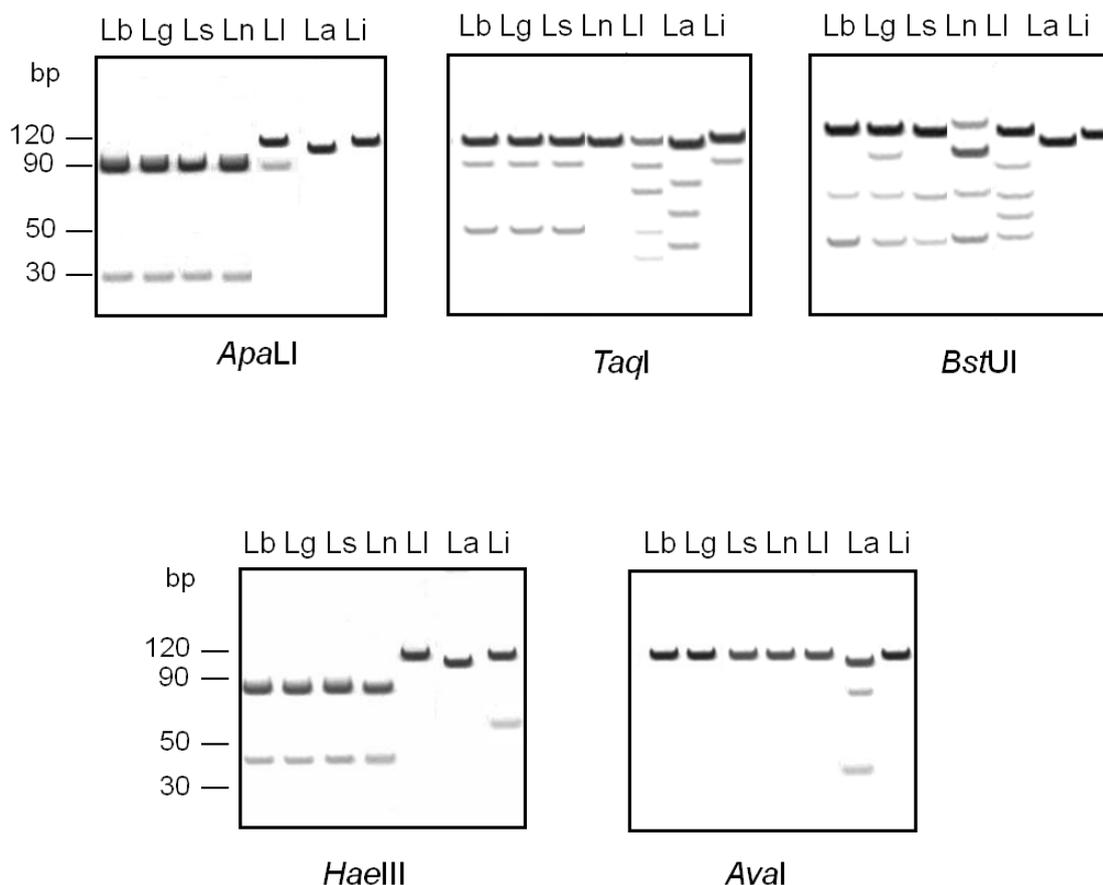


Figura 4.3: Perfis de PCR RFLP de kDNA de cepas de *Leishmania*, com as enzimas *ApaLI*, *TaqI*, *BstUI*, *HaeIII* e *AvaLI*. bp= tamanho em pares de base do marcador de peso molecular; *Lb*, *L. braziliensis*; *Lg*, *L. guyanensis*; *Ls*, *L. shawi*; *Ln*, *L. naiffi*, *Ll*, *L. lainsoni* *La*, *L. amazonensis*; *Li*, *L. infantum*.

No caso da PCR para o gene *g6p*, a metodologia usada visava a discriminação dos dois subgêneros, *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)* e, no caso do subgênero *L. (Viannia)*, a separação de *L. braziliensis* das demais espécies deste subgênero. Esta discriminação foi observada, em concordância com a identificação por isoenzimas, embora algumas exceções tenham sido detectadas quando outras cepas, que não as de referência, foram utilizadas (Tabela 4.1).

Através do RFLP dos produtos de amplificação obtidos para a região ITS-1 com a enzima *Sau3AI* foi possível separar as espécies de *Leishmania* analisadas, embora só tenha sido possível distinguir *L. guyanensis* de *L. braziliensis* quando a eletroforese do produto digerido foi realizada em gel de poliacrilamida 12,5% (Genephor®) corado pela prata que é de alta resolução. (Figura 4.4). Os perfis obtidos para as cepas de referência se repetiram quando um painel maior de cepas de cada espécie foi utilizado, corroborando os resultados de identificação obtidos por eletroforese de enzimas, mas também apresentando uma única exceção (Tabela 4.1).

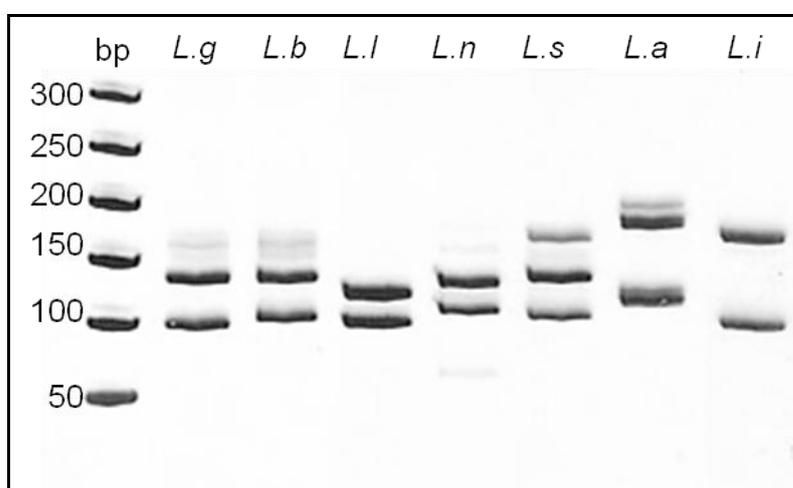


Figura 4.4: Perfis de PCR-RFLP de ITS1 observado para cepas de referência de diferentes espécies de *Leishmania* após a digestão do produto de PCR com a enzima *Sau3AI*. Gel de poliacrilamida 12,5% (Genephor®) corado pela prata. bp= tamanho em pares de base do marcador de peso molecular 50pb; *Lg*, *L. guyanensis*; *Lb*, *L. braziliensis*; *Ll*, *L. lainsoni*; *Ln*, *L. naiffi*; *Ls*, *L. shawi*; *La*, *L. amazonensis*; *Li*, *L. infantum*.

A PCR-RFLP dos produtos de PCR obtidos para o gene *hsp70* (1.400pb) possibilitou a distinção de todas as espécies quando duas enzimas de restrição foram utilizadas, *Bst*UI e *Hae*III (Figura 4.5). Embora a figura apresente o resultado obtido após eletroforese em gel de alta resolução, a mesma discriminação foi observada em gel de acrilamida 6% (dados não apresentados). Assim como para

ITS1, os perfis obtidos se repetiram quando mais cepas de cada espécie foram analisadas e os resultados de identificação corroboraram parcialmente aqueles previamente determinados por MLEE (Tabela 4.1).

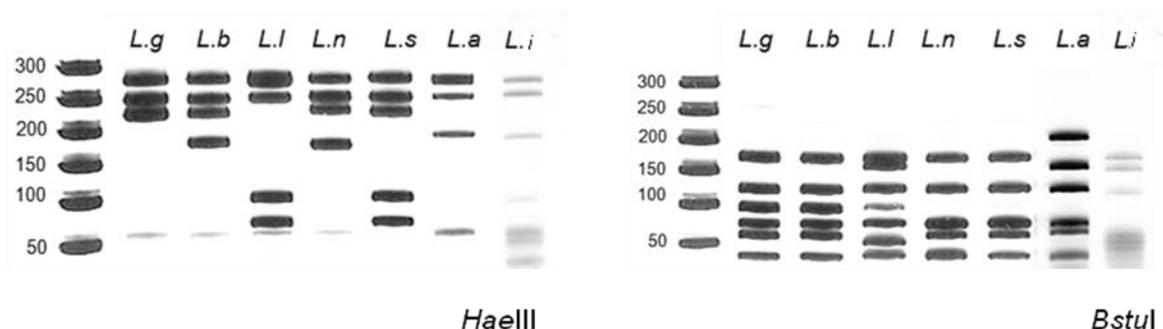


Figura 4.5: Perfis de PCR-RFLP de *hsp70* 1.400bp observado para cepas de referência de diferentes espécies de *Leishmania* após a digestão do produto de PCR com as enzimas *BstUI* e *HaellI*. Gel de poliacrilamida 12,5% (Genephor®) corado pela prata. PM= marcador de peso molecular 50pb. *L.g*, *L. guyanensis*; *L.b*, *L. braziliensis*; *L.l*, *L. lainsoni*; *L.n*, *L. naiffi*; *L.s*, *L. shawi*; *L.a*, *L. amazonensis*; *L.i*, *L. infantum*.

Os produtos amplificados com os iniciadores direcionados para regiões internas do gene *hsp70* foram digeridos com diversas enzimas de restrição. As enzimas *Bccl*, *Rsal*, *Aval*, *KpnI* e *SphI* não distinguiram entre as espécies, independente dos pares de iniciadores utilizados. Os produtos amplificados a partir da reação de PCR com os iniciadores *hsp70A* ou *hsp70C* apresentaram o mesmo perfil após restrição com as enzimas *HaellI*, *Mbol* e *BstUI* e estes permitiram, quando analisados em conjunto, a distinção de todas as espécies avaliadas. A enzima *HaellI* produziu perfis idênticos para *L. lainsoni* e *L. shawi* e para *L. braziliensis* e *L. naiffi*, enquanto *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* apresentaram perfis únicos. A enzima *BstUI* permitiu distinguir *L. naiffi* e *L. braziliensis*, assim como *L. shawi* e *L. lainsoni*, que também puderam ser distinguidas pela enzima *Mbol* (Figura 4.6). Considerando os resultados obtidos com as PCRs *hsp70A* e *hsp70 C*, somente utilizamos a PCR *hsp70C* para avaliar a reprodutibilidade na identificação de espécies quando mais cepas foram analisadas.

A PCR-RFLP de *hsp70C* com as enzimas *HaellI*, *BstUI* e *Mbol* também foi eficiente na identificação das espécies quando diversas cepas representando espécies distintas de *Leishmania* foram avaliadas (Tabela 4.4).

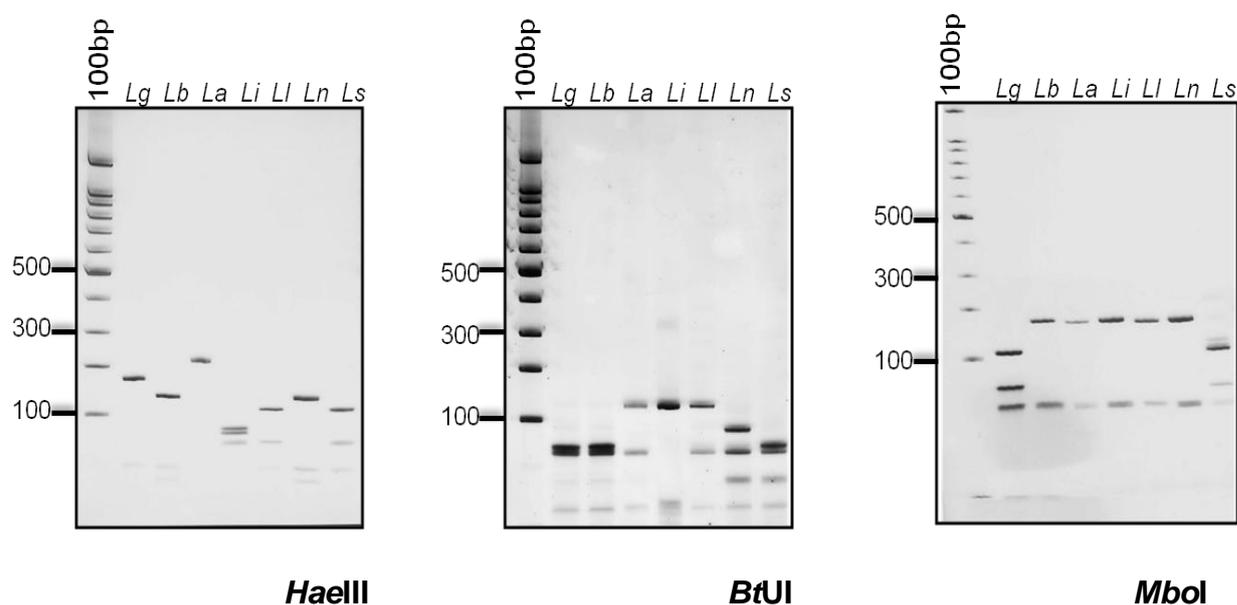
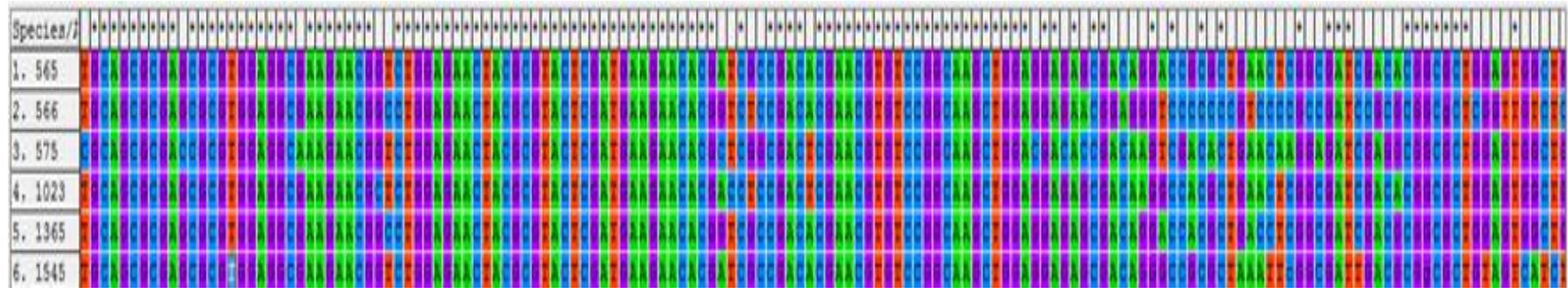


Figura 4.6: Perfis de PCR-RFLP de *hsp70C* observados para cepas de referência de diferentes espécies de *Leishmania* após a digestão do produto com as enzimas *HaellI*, *BstUI* e *Mbol*. Gel de poliácridamida 6% corado pela prata. PM= marcador de peso molecular de 100bp. *Lg*, *L. guyanensis*; *Lb*, *L. braziliensis*; *La*, *L. amazonensis*; *Li*, *L. infantum*; *Ll*, *L. lainsoni*; *Ls*, *L. shawi*; *Ln*, *L. naiffi*.

Considerando que o polimorfismo observado pela RFLP está diretamente relacionado com diferenças nas sequências de DNA dos produtos amplificados, analisamos as sequências dos produtos obtidos pela PCR *hsp70C*. Esta etapa não foi realizada para os demais alvos já que as sequências destes alvos (no caso kDNA, ITS-1 e *hsp70* 1.400pb) já são conhecidas, estão depositadas em bancos públicos e seu potencial em distinguir entre as espécies de *Leishmania* já está relatado (da Silva *et al.*, 2010; Volpini *et al.*, 2004; Schonian *et al.*, 2003). A análise das sequências obtidas para os produtos amplificados pela PCR *hsp70C* demonstrou polimorfismos nas sequências que permitem a identificação das espécies analisadas neste estudo, corroborando os resultados obtidos pela PCR-RFLP e reforçando o potencial desta região para identificação de espécies de *Leishmania* (Figura 4.7).



A

```

[
          1111 1111111111 1111]
[
      11234 4777880111 2222233333 4445]
[
  1346801131 2679058139 1346912347 1454]
IOC-L 565   GCGCAATGGG TATGCAGGGG ACGGGACTCC CCAG
IOC-L 575   CTTGCGCCA. .C..GTCCCA TGAA...AAA .GG.
IOC-L 566   .....a..... CG.T..... T.....
IOC-L 1023  .....C ..CT.T...A G.A.....
IOC-L 1365  .....CG..... ..A..C.... ..G.
IOC-L 1545  .....G...A.A.T. T.GT

```

B

Figura 4.7: Alinhamento das sequências obtidas para cepas de referência de algumas espécies de *Leishmania* após o sequenciamento dos produtos de PCR amplificados correspondentes a região *hsp70C*. A- Captura de imagem de parte do alinhamento. B- Polimorfismos encontrados, com as suas respectivas posições. (Imagens obtidas a partir do programa MEGA) 565 *L.guyanensis*, 566 *L.braziliensis*, 575 *L.amazonensis*, 1023 *L.lainsoni*, 1365 *L.naiffi* e 1545 *L.shawi*.

Tabela 4.1. Cepas de *Leishmania* (N=70) previamente caracterizadas por MLEE e utilizadas para validar a capacidade dos ensaios de PCR em distinguir diferentes espécies de *Leishmania*.

IOC	Código Internacional	Identificação de espécies por MLEE	Zimodema (IOC/Z)	PCR-RFLP mkDNA	PCR-G6P	PCR-RFLP ITS1	PCR-RFLP <i>hsp70</i>	PCR-RFLP <i>hsp70 C</i>
L575 ¹	IFLA/BR/1967/PH8	<i>La</i>	07	<i>La</i>	<i>L(L)</i>	<i>La</i>	<i>La</i>	<i>La</i>
L114	MHOM/VE/XXXX/L64	<i>La</i>	07	<i>La</i>	<i>L(L)</i>	<i>La</i>	<i>La</i>	<i>La</i>
L185	MHOM/BR/1977/LTB0016	<i>La</i>	07	<i>La</i>	<i>L(L)</i>	<i>La</i>	<i>La</i>	<i>La</i>
L569	MHOM/BR/1982/M69	<i>La</i>	07	<i>La</i>	<i>L(L)</i>	<i>La</i>	<i>La</i>	<i>La</i>
L615	MHOM/BR/1985/MNB	<i>La</i>	07	<i>La</i>	<i>L(L)</i>	<i>La</i>	<i>La</i>	<i>La</i>
L930	MHOM/BR/1987/BA-89	<i>La</i>	07	<i>La</i>	<i>L(L)</i>	<i>La</i>	<i>La</i>	<i>La</i>
L982	MDID/BR/1987/IM3217	<i>La</i>	07	<i>La</i>	<i>L(L)</i>	<i>La</i>	<i>La</i>	<i>La</i>
L2571	MHOM/BR/2003/NJS	<i>La</i>	07	<i>La</i>	<i>L(L)</i>	<i>La</i>	<i>La</i>	<i>La</i>
L579 ¹	MHOM/BR/1974/PP75	<i>Li</i>	01	<i>Li</i>	<i>L(L)</i>	<i>Li</i>	<i>Li</i>	<i>Li</i>
L2565	MHOM/BR/2003/VSV	<i>Li</i>	01	<i>Li</i>	<i>L(L)</i>	<i>Li</i>	<i>Li</i>	<i>Li</i>

L2566	MHOM/BR/2003/MMV	<i>Li</i>	01	<i>Li</i>	<i>L(L)</i>	<i>Li</i>	<i>Li</i>	<i>Li</i>
L2568	MHOM/BR/2003/BN	<i>Li</i>	01	<i>Li</i>	<i>L(L)</i>	<i>Li</i>	<i>Li</i>	<i>Li</i>
L2569	MCAN/BR/2003/HUGER	<i>Li</i>	01	<i>Li</i>	<i>L(L)</i>	<i>Li</i>	<i>Li</i>	<i>Li</i>
L2570	MHOM/BR/2003/VC	<i>Li</i>	01	<i>Li</i>	<i>L(L)</i>	<i>Li</i>	<i>Li</i>	<i>Li</i>
L566 ¹	MHOM/BR/1975/M2903	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L1731	MAGO/BR/1992/IM154	<i>Lb</i>	53	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>NLb</i>	<i>Lg</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2152	MHOM/BR/1996/AFN	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2419	MHOM/BR/1999/JAS	<i>Lb</i>	73	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2420	MHOM/BR/1999/PCS	<i>Lb</i>	74	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2427	MHOM/BR/1999/SJB	<i>Lb</i>	74	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2491	MHOM/BR/2002/NMT-RBO005	<i>Lb</i>	78	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Ln</i>	<i>Lb</i>
L2492	MHOM/BR/2002/NMT-RBO011	<i>Lb</i>	83	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>NLb</i>	<i>Lb</i>	<i>Ln</i>	<i>Lb</i>
L2495	MHOM/BR/2002/NMT-RBO025	<i>Lb</i>	78	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Ln</i>	<i>Lb</i>

L2498	MHOM/BR/2002/NMT-RBO029	<i>Lb</i>	84	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>NLb</i>	<i>Lb</i>	<i>Ln</i>	<i>Lb</i>
L2499	MHOM/BR/2002/NMT-RBO035	<i>Lb</i>	81	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Ln</i>	<i>Lb</i>
L2501	MHOM/BR/2002/NMT-RBO037	<i>Lb</i>	79	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Ln</i>	<i>Lb</i>
L2194	MHOM/BR/1997/GSL	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2195	MHOM/BR/1997/MBS-B	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2196	MHOM/BR/1997/JCM	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2197	MHOM/BR/1997/NSL	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2198	MHOM/BR/1997/EOC	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2199	MHOM/BR/1997/SIS	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2200	MHOM/BR/1997/VAP	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2202	MHOM/BR/1997/JP-2	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2203	MHOM/BR/1997/MAS	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2237	MHOM/BR/1997/JFM	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>

L2251	MHOM/BR/1997/SFS	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2254	MHOM/BR/1997/ECF	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2501	MHOM/BR/2002/NMT-RBO037	<i>Lb</i>	79	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2538	MHOM/BR/2002/EMM	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2823	MHOM/BR/2001/RGJ	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2824	MHOM/BR/2001/LCAS	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2825	MHOM/BR/2002/DAM	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2918	MHOM/BR/2006/ICA	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L3072	MHOM/BR/2008/NC	<i>Lb</i>	27	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L2502	MHOM/BR/2002/NMT-RBO040	<i>Lb</i>	82	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>	<i>Lb</i>
L565 ¹	MHOM/BR/1975/M4147	<i>Lg</i>	23	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>NLb</i>	<i>Lg</i>	<i>Lg</i>	<i>Lg</i>
L2366	MHOM/BR/1997/NMT-MAO258P	<i>Lg</i>	23	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>NLb</i>	<i>Lg</i>	<i>Lg</i>	<i>Lg</i>
L2369	MHOM/BR/1997/NMT-MAO261P	<i>Lg</i>	23	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>NLb</i>	<i>Lg</i>	<i>Lg</i>	<i>Lg</i>

L2380	MHOM/BR/1997/NMT-MAO301P	<i>Lg</i>	23	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>NLb</i>	<i>Lg</i>	<i>Lg</i>	<i>Lg</i>
L2383	MHOM/BR/1997/NMT-MAO302G	<i>Lg</i>	23	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>NLb</i>	<i>Lg</i>	<i>Lg</i>	<i>Lg</i>
L2393	MHOM/BR/1997/NMT-MAO309G	<i>Lg</i>	23	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>NLb</i>	<i>Lg</i>	<i>Lg</i>	<i>Lg</i>
L2493	MHOM/BR/2002/NMT-RBO013	<i>Lg</i>	23	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>NLb</i>	<i>Lg</i>	<i>Lg</i>	<i>Lg</i>
L1023 ¹	MHOM/BR/1981/M6426	<i>LI</i>	15	<i>LI</i>	<i>NLb</i>	<i>LI</i>	<i>LI</i>	<i>LI</i>
L1058	MCOE/BR/1983/IM1367	<i>LI</i>	15	<i>LI</i>	<i>NLb</i>	<i>LI</i>	<i>LI</i>	<i>LI</i>
L2490	MHOM/BR/2002/NMT-RBO004	<i>LI/Ln</i>	87	<i>LI</i>	<i>NLb</i>	<i>LI</i>	<i>LI</i>	<i>LI</i>
L2496	MHOM/BR/2002/NMT-RBO027G	<i>LI</i>	86	<i>LI</i>	<i>NLb</i>	<i>LI</i>	<i>LI</i>	<i>LI</i>
L2500	MHOM/BR/2002/NMT-RBO036	<i>LI</i>	86	<i>LI</i>	<i>NLb</i>	<i>LI</i>	<i>LI</i>	<i>LI</i>
L2503	MHOM/BR/2002/NMT-RBO044	<i>LI</i>	86	<i>LI</i>	<i>NLb</i>	<i>LI</i>	<i>LI</i>	<i>LI</i>
L1365 ¹	MDAS/BR/1979/M5533	<i>Ln</i>	36	<i>Ln</i>	<i>NLb</i>	<i>Ln</i>	<i>Ln</i>	<i>Ln</i>
L992	MDAS/BR/1987/IM3280	<i>Ln</i>	42	<i>Ln</i>	<i>NLb</i>	<i>Ln</i>	<i>Ln</i>	<i>Ln</i>
L993	MDAS/BR/1987/IM3281	<i>Ln</i>	36	<i>Ln</i>	<i>NLb</i>	<i>Ln</i>	<i>Ln</i>	<i>Ln</i>

L995	MDAS/BR/1987/IM3292	<i>Ln</i>	36	<i>Ln</i>	<i>NLb</i>	<i>Ln</i>	<i>Ln</i>	<i>Ln</i>
L1123	MHOM/BR/1986/IM2736	<i>Ln</i>	36	<i>Ln</i>	<i>NLb</i>	<i>Ln</i>	<i>Ln</i>	<i>Ln</i>
L1871	MHOM/BR/1991/IM3740	<i>Ln</i>	36	<i>Ln</i>	<i>NLb</i>	<i>Ln</i>	<i>Ln</i>	<i>Ln</i>
L1953	MHOM/BR/1994/IM4000	<i>Ln</i>	49	<i>Ln</i>	<i>NLb</i>	<i>Ln</i>	<i>Ln</i>	<i>Ln</i>
L1939	ISQU/BR/1994/IM3936	<i>Ln</i>	49	<i>Ln</i>	<i>NLb</i>	<i>Ln</i>	<i>Ln</i>	<i>Ln</i>
L1545 ¹	MCEB/BR/1984/M8408	<i>Ls</i>	26	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>NLb</i>	<i>Ls</i>	<i>Ls</i>	<i>Ls</i>
L1067	IWHI/BR/1985/IM2324	<i>Ls</i>	26	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>NLb</i>	<i>Ls</i>	<i>Ls</i>	<i>Ls</i>
L1069	IWHI/BR/1985/IM2330	<i>Ls</i>	26	<i>Lb/Lg/Ls</i>	<i>NLb</i>	<i>Ls</i>	<i>Ls</i>	<i>Ls</i>

¹Cepas de referência

La, *L. amazonensis*; Li, *L. infantum*, Lb, *L. braziliensis*; Lg, *L. guyanensis*; Ll, *L. lainsoni*; Ln, *L. naiffi*; Ls, *L. shawi*

L(L), amostras positivas para PCR-*G6P* usando a combinação de iniciadores específicos para *L. (Leishmania)*; NLb, amostras positivas para PCR-*G6P* usando a combinação de iniciadores específica para *L. (Viannia)* e também a combinação de iniciadores que amplificam as espécies não-*L. braziliensis*.

É importante mencionar que a cepa L1731, caracterizada por MLEE como *L. braziliensis*, apresentou um perfil de PCR-RFLP para ITS1 compatível com *L. guyanensis* e o resultado da PCR-*g6p* indicou que esta cepa seria uma não-*L. braziliensis*. As cepas L2492 e L2498, embora identificadas como *L. braziliensis* por MLEE e por PCR-RFLP ITS1, apresentaram um perfil de não-*L. braziliensis* para PCR-*g6p* e de *L. naiffi* para PCR-RFLP *hsp70* (1.400pb). As cepas L2499 e L2501 foram identificadas como *L. braziliensis* por MLEE, resultado este corroborado por PCR-RFLP ITS1, PCR-*g6p* e PCR-RFLP *hsp70C*. No entanto, estas cepas apresentaram perfil de *L. naiffi* para PCR-RFLP *hsp70* (1.400pb). Todas as cepas que apresentaram resultado discordante entre algum marcador e MLEE são variantes enzimáticas de *L. braziliensis*. As cepas identificadas como *L. braziliensis* por MLEE e que apresentaram perfil de não *L. braziliensis* para PCR-*g6p* apresentam perfil de eletromorfos atípicos para enzima *g6pDH*, ou seja, diferente do que é observado para a cepa de referencia e a grande maioria de cepas identificadas como *L. braziliensis*.

4.2. Avaliação da inibição da PCR em presença de DNA humano.

DNA humano extraído de sangue de indivíduo saudável foi misturado com DNA de promastigotas em concentrações definidas para avaliarmos o efeito da concentração do DNA humano na inibição das reações de PCR, podendo gerar resultados falso negativos. Este DNA foi quantificado e diluído nas concentrações de 200ng/μl, 20ng/μl e 200pg/μl e misturado a diversas concentrações de DNA de promastigotas. Reações de PCR direcionadas para amplificação de kDNA, ITS-1 e *hsp70* (1.400pb, *hsp70A* e *hsp70C*) foram realizadas. Todas as reações de PCR realizadas utilizando 200pg de DNA humano foram positivas, ou seja, independente do alvo e da quantidade de DNA de promastigota utilizada. No entanto, não foram observadas reações positivas quando DNA humano foi utilizado nas concentrações de 20ng e 200ng, parecendo haver inibição da reação de PCR.

4.3. Avaliação do percentual de positividade de cada alvo usando fragmentos de tecidos coletados de animais experimentais, infectados com diferentes espécies de *Leishmania*, e processados de diversas formas.

As lâminas preparadas com material obtidos dos animais experimentalmente infectados foram examinadas por microscopia ótica para evidenciarmos a presença de amastigotas e utilizarmos os resultados como critério de infecção (Figura 4.8 - 4.9). Ao analisarmos as lâminas observamos que não foi possível observar formas amastigotas em todas, no entanto algumas destas lâminas onde não foram evidenciadas formas amastigotas, mostraram-se positivas na PCR. Foram observadas formas amastigotas somente nas lâminas das amostras referentes as cepas de *L.braziliensis*, *L.naiffi*, *L. amazonensis* e *L.guyanensis* (Figura 4.9).

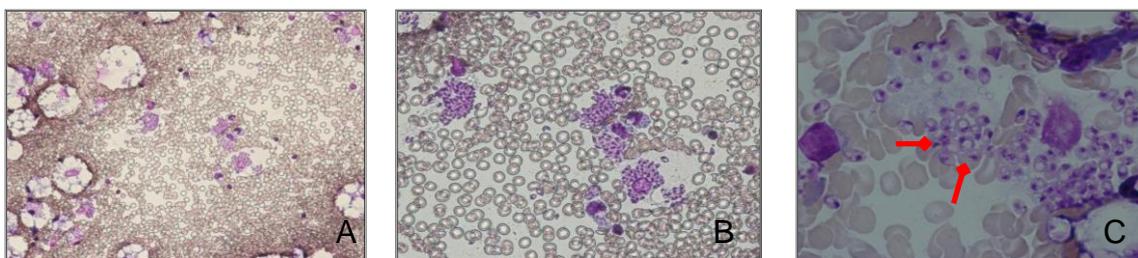


Figura 4.8: Aposição em lâminas de fragmentos de tecido de lesões de hamsters experimentalmente infectados com *L.amazonensis* e coradas com Giemsa: Observação de formas amastigotas interiorizadas em macrófagos, que estão indicadas por setas vermelhas na figura. A-20x, B-40x e C-100x.



Figura 4.9: Aposição em lâminas de fragmentos de tecido de lesões de hamsters experimentalmente infectados com diferentes espécies e corados com Giemsa: Observação de formas amastigotas interiorizadas em macrófagos , que estão indicadas pelas setas vermelhas na figura (100x). A-*L.guyanensis*,B-*L.braziliensis* e C-*L.naiffi*.

Como explicado anteriormente, foram realizadas reações de PCR para os diferentes alvos empregando DNA extraído de tecido congelado, de papel de filtro contendo aposições de tecidos e das lâminas apresentadas acima. O marcador kDNA apresentou uma boa sensibilidade (100%) e foi utilizado como padrão ouro em todas as reações, quando o DNA alvo foi proveniente de fragmento de tecido congelado ou de aposições em papel de filtro. A sensibilidade foi de apenas 36% quando o DNA alvo empregado foi extraído de lâminas coradas. O marcador ITS-1 não mostrou boa eficiência na detecção de DNA, independente do tipo de amostra utilizada, apresentando positividade para 50% das amostras quando utilizou-se DNA extraído de tecido congelado e apenas uma amostra foi positiva quando utilizou-se DNA de lâmina ou de papel de filtro, sendo estas distintas. Uma baixa eficiência foi observada também para *hsp70C*, apresentando 66,7% (4/6) de positividade quando a fonte de DNA foi tecido congelado e apenas uma amostra positiva quando utilizou-se DNA extraído de lâmina ou papel de filtro 16,7%(Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Diagnóstico clínico-parasitológico de animais experimentalmente infectados com espécies de *Leishmania* e resultado das reações de PCR para diferentes alvos empregando DNA extraído de diferentes tipos de amostras preparadas com tecidos coletados destes animais.

				kDNA			ITS1			<i>hsp70C</i>		
	PL	VA	DCP	TC	L	PF	TC	L	PF	TC	L	PF
<i>L. amazonensis</i>	sim	sim	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>L. braziliensis</i>	sim	sim	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>L. guyanensis</i>	sim	sim	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>L. lainsoni</i>	sim	não	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>L. naiffi</i>	sim	sim	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
<i>L. shawi</i>	não	não	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-

PL= Presença de Lesão, VA= Visualização de amastigotas, DCP= Diagnóstico clínico-parasitológico, TC= Tecido congelado, L= Lâminas, PF= Papel de filtro

+= reação de PCR positiva; -= reação de PCR negativa

É importante mencionar que reações de PCR positivas foram observadas em material coletado de animais que não apresentaram sinais clínicos (ou seja, lesão) e/ou cujas lâminas não apresentaram indicativo de infecção (visualização de formas amastigotas), indicando que a visualização de amastigotas nem sempre é possível, mostrando que as vezes a mesma não pode ser considerada como critério de definição de infecção, já que como foi demonstrado na literatura, esta metodologia alcança até 77,5% de positividade quando conciliado três tipos de coleta de material (aposição de fragmento de tecido, raspado da borda exterior e interior).

Este experimento foi utilizado para determinar a acurácia diagnóstica de cada PCR utilizada. Foi determinada a acurácia diagnóstica avaliando o grau de correspondência entre a resposta obtida por PCR e a resposta obtida pelo

diagnóstico clínico-parasitológico. Para isso consideramos as amostras positivas para o diagnóstico clínico-parasitológico e para os métodos de PCR, as amostras negativas para o diagnóstico clínico-parasitológico e para os métodos de PCR e o número total de amostras (Tabela 4.2). O diagnóstico clínico foi determinado pela presença (positivo) ou ausência (negativo) de lesão em um período de até 8 semanas após o inóculo dos parasitas. O diagnóstico parasitológico foi determinado através da visualização de amastigotas nas lâminas preparadas com aposição de tecidos corados pelo Giemsa.

A acurácia diagnóstica (AD) de cada método foi então determinada considerando:

$$AD = \frac{\text{Amostra PCR e DCP(positivo)} + \text{Amostra PCR e DCP(negativo)}}{\text{número total de amostras}}$$

Tabela 4.3: Acurácia diagnóstica determinada para os marcadores kDNA, ITS1 e *hsp70C*, analisando diferentes tipos de amostras.

	kDNA			ITS1			<i>Hsp70C</i>		
	TC	L	PF	TC	L	PF	TC	L	PF
Acurácia diagnóstica	0,83	0,66	0,83	0,66	0,33	0,33	0,83	0,33	0,33

TC= Tecido congelado, L= Lâminas, PF= Papel de filtro

A mesma acurácia diagnóstica foi observada para os marcadores kDNA e *hsp70C* quando analisamos DNA extraídos de tecido congelado, assim como extraídos de papel de filtro e submetidos a PCR para o kDNA. A menor acurácia diagnóstica foi observada quando utilizamos DNA extraído das lâminas preparadas com os tecidos coletados dos animais infectados.

4.4. Percentual de positividade dos diversos alvos frente a material clínico e capacidade em identificar espécies de *Leishmania*.

Para esta etapa do estudo empregamos apenas DNA extraído de fragmento de tecido de lesões cutâneas de pacientes diagnosticados com leishmaniose. Considerando os resultados anteriores, decidimos avaliar a sensibilidade dos marcadores kDNA, ITS1, *g6p* e *hsp70C*. Usando PCR-RFLP ou combinação de iniciadores (no caso de *g6p*) realizamos também a identificação do agente etiológico, ao nível específico ou não, conforme resultados descritos anteriormente (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Detecção e identificação de *Leishmania spp.* por diferentes métodos baseados na PCR empregando 99 amostras de DNA extraídos de tecido coletado de lesões de pacientes com diagnóstico clínico de leishmaniose.

<i>Amostras</i>	<i>Kdna</i> *	<i>PCR-RFLP kDNA</i>	<i>ITS1</i>	<i>PCR-RFLP ITS1</i>	<i>G6P</i>	<i>ISVB</i>	<i>ISVNB</i>	<i>hsp70C</i>	<i>PCR-RFLP hsp70C</i>
RB-000	+	Lb/Lg/Ls	-	-	-	-	-	-	-
RB-004	+	L.l.	+	Ln/LI	-	-	+	+	L.l.
RB-005	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	+	-	+	Ln
RB-006	+	LI	-	-	+	-	-	+	L.l
RB-007	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	+	-	-	-
RB-008	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	+	-	+	L.b
RB-009	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	+	-	+	Lb
RB-010	+	L.l	+	L.l.	+	-	-	+	LI
RB-011	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	+	-	+	Ln
RB-012	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	+	-	-	-
RB-013	+	Lb/Lg/Ls	+	Lg	+	+	+	+	Lg
RB-014	+	L.l	+	L.l.	-	-	-	+	LI
RB-015	+	Lb/Lg/Ls	+	Lg	+	+	-	+	Lg
RB-016	+	L.l	+	L.l.	-	-	-	+	LI
RB-017	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	+	-	+	Lb
RB-019	+	Lb/Lg/Ls	-	-	-	-	-	+	Lb

<i>Amostras</i>	<i>kDNA</i>	<i>PCR-RFLP kDNA</i>	<i>ITS1</i>	<i>PCR-RFLP ITS1</i>	<i>G6P</i>	<i>ISVB</i>	<i>ISVNB</i>	<i>hsp70C</i>	<i>PCR-RFLP hsp70C</i>
RB-020	+	L.I	+	L.I	-	-	-	+	LI
RB-021	+	L.I	+	L.I	-	-	-	+	LI
RB-022	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	+	-	+	Lb
RB-023	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	+	-	+	Lb
RB-024	+	Lb/Lg/Ls	-	-	-	-	-	-	-
RB-025	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	+	Lb
RB-026	+	Lb/Lg/Ls	-	-	-	-	-	+	Lb
RB-027	+	L.I	+	L.I	-	-	-	-	-
RB-028	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	+	-	+	Lb
RB-029	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	+	-	+	Lb
RB-030	+	Lb/Lg/Ls	-	-	-	-	-	-	-
RB-031	+	L.I	+	L.I	-	-	+	+	LI
RB-032	+	L.I	+	L.I	-	-	+	+	LI
RB-033	+	Lb/Lg/Ls	-	-	-	-	-	-	-
RB-034	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	+	Lb
RB-035	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	+	-	+	Lb
RB-036	+	L.I	+	L.I	-	-	-	-	-
RB-037	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	+	Lb
RB-038	+	Ln	+	Ln	-	-	-	+	Ln
RB-039	+	Lb/Lg/Ls	-	-	-	-	-	-	-
RB-040	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	+	-	+	Lb
RB-041	+	LI	-	-	-	-	-	-	-
RB-042	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	-	-
RB-043	+	L.I	+	L.I	-	-	+	+	LI
RB-044	+	L.I	+	L.I	-	-	+	+	LI
RB-045	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	+	-	+	Lb
RB-046	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	+	Lb
RB-047	+	Ln	+	Ln	-	-	-	+	Ln

<i>Amostras</i>	<i>kDNA</i>	<i>PCR-RFLP kDNA</i>	<i>ITS1</i>	<i>PCR-RFLP ITS1</i>	<i>G6P</i>	<i>ISVB</i>	<i>ISVNB</i>	<i>hsp70C</i>	<i>PCR-RFLP hsp70C</i>
RB-048	+	L.I	+	L.I	-	-	-	+	LI
RB-049	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	+	Lb
RB-050	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	-	-
RB-051	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	-	-	+	Lb
RB-052	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	+	Lb
RB-053	+	Ln	+	Ln	+	-	-	+	Lb
IPEC-01	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	+	-	+	Lb
IPEC-02	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	+	-	+	Lb
IPEC-03	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	-	-
IPEC-04	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	+	Lb
IPEC-05	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	+	Lb
IPEC-06	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	+	Lb
IPEC-07	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	-	-
IPEC-08	+	Lb/Lg/Ls	-	-	+	+	-	-	-
IPEC-09	+	Lb/Lg/Ls	-	-	-	-	-	+	Lb
IPEC-10	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	+	Lb
IPEC-11	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	+	-	-	-
IPEC-12	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	+	-	-	-
IPEC-13	+	Ln	+	Ln	+	-	+	+	Ln
IPEC-14	+	Lb/Lg/Ls	-	-	+	+	-	+	Lb
IPEC-15	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	+	Lb
IPEC-16	+	Lb/Lg/Ls	-	-	-	-	-	+	Lb
IPEC-17	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	+	Lb
IPEC-18	+	Lb/Lg/Ls	-	-	-	-	-	+	Lb
IPEC-19	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	+	Lb
IPEC-20	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	-	-
IPEC-21	-	-	+	Lb	-	-	-	-	-
IPEC-22	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	+	+	-	-	-

<i>Amostras</i>	<i>kDNA</i>	<i>PCR-RFLP kDNA</i>	<i>ITS1</i>	<i>PCR-RFLP ITS1</i>	<i>G6P</i>	<i>ISVB</i>	<i>ISVNB</i>	<i>hsp70C</i>	<i>PCR-RFLP hsp70C</i>
IPEC-23	+	Lb/Lg/Ls	-	-	-	-	-	+	Lb
IPEC-24	+	Lb/Lg/Ls	-	-	-	-	-	+	Lb
IPEC-25	+	Lb/Lg/Ls	-	-	-	-	-	+	Lb
IPEC-26	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	+	Lb
IPEC-27	-	-	+	Lb	-	-	-	+	Lb
IPEC-28	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	-	-	-	+	Lb
IPEC-29	+	Lb/Lg/Ls	-	-	-	-	-	-	-
MT-01	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	NR	NR	NR	-	-
MT-02	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	NR	NR	NR	-	-
MT-03	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	NR	NR	NR	+	Lb
MT-04	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	NR	NR	NR	+	Lb
MT-05	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	NR	NR	NR	+	Lb
MT-06	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	NR	NR	NR	+	Lb
MT-07	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	NR	NR	NR	-	-
MT-08	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	NR	NR	NR	+	Lb
MT-09	+	Lb/Lg/Ls	+	Ls	NR	NR	NR	+	Ls
MT-10	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	NR	NR	NR	+	Lb
MT-11	+	LI	+	LI	NR	NR	NR	+	LI
MT-12	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	NR	NR	NR	+	Lb
MT-13	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	NR	NR	NR	-	-
MT-14	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	NR	NR	NR	+	Lb
MT-15	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	NR	NR	NR	+	Lb
MT-16	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	NR	NR	NR	-	-
MT-17	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	NR	NR	NR	-	-
MT-18	+	La	+	La	NR	NR	NR	+	La
MT-19	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	NR	NR	NR	+	Lb
MT-20	+	Lb/Lg/Ls	+	Lb	NR	NR	NR	+	Lb
Total Positivos	97	---	81	---	26	24	7	72	---

RB, amostras provenientes de pacientes de Rio Branco, Acre; IPEC, amostras provenientes de pacientes do Rio de Janeiro; MT, amostras provenientes de pacientes do Mato Grosso.

Lb, *L. braziliensis*; *Lg*, *L. guyanensis*; *Ls*, *L. shawi*; *Ln*, *L. naiffi*, *Ll*, *L. lainsoni* *La*, *L. amazonensis*; += reações de PCR positivas; -= reações de PCR negativas; *NR*= não realizado

* Padrão ouro.

Apenas duas amostras foram negativas para a PCR direcionada para amplificação do kDNA (97/99, 98% de positividade). A sensibilidade da PCR ITS1 em detectar DNA de *Leishmania* em fragmento de tecido congelado foi de 81,8%, enquanto PCR *g6p* apresentou 41,8% de sensibilidade e *hsp70C* 72,7% (Tabela 4.5). No caso de *g6p* a metodologia não foi aplicada as amostras provenientes do Mato Grosso em função da quantidade de DNA disponível.

Tabela 4.5: Positividade das PCRs kDNA, ITS1, *g6p* e *hsp70C* quando aplicadas a amostras de DNA extraído de fragmentos de tecido coletados de pacientes com diagnóstico clínico de leishmaniose.

	<i>PCR</i>			
	<i>kDNA</i>	<i>ITS1</i>	<i>g6p</i>	<i>hsp70C</i>
	(<i>n</i> =99)	(<i>n</i> =99)	(<i>n</i> =79)	(<i>n</i> =99)
<i>Amostras</i>				
Positivas	97	81	33	72
Negativas	2	18	46	27

Das 99 amostras analisadas, 79 foram positivas para kDNA e ITS1, 71 para kDNA e *hsp70C* e 32 para kDNA e *g6p*. Das duas amostras negativas para kDNA ambas foram positivas para ITS1, apenas uma foi positiva para *hsp70C* e ambas negativas para *g6p*. Considerando estes dados, determinamos a acurácia diagnóstica de cada método comparando com a PCR kDNA e os valores obtidos foram (0,79), (0,91) e (0,43), para ITS1, *hsp70C* e *g6p*, respectivamente. Das 99

amostras analisadas, 63 foram positivas por ITS1 e *hsp70C* e apenas 7 foram negativas para as duas metodologias. Observamos 19 amostras positivas apenas para ITS1 e 10 apenas para *hsp70C*. A concordância entre as duas metodologias, ou seja PCR-ITS1 e PCR-*hsp70C*, foi baixa, considerando o valor de Kappa=0,149 (p=0,062).

Como já esperado, a PCR-RFLP do kDNA permitiu identificar as espécies *L. lainsoni*, *L. naiffi* e *L. amazonensis* e um grupo de amostras apresentou perfil idêntico sugestivo das espécies *L. braziliensis* ou *L. guyanensis* ou *L. shawi*. Apenas 23 amostras foram identificadas tanto pela PCR-RFLP ITS1, como pela PCR-*hsp70C* e pela PCR *g6p*. Destas, houve concordância nos resultados obtidos para 18 amostras; duas apresentaram resultados não concordantes (RB005 e RB011), tendo sido identificadas como *L. braziliensis* ou *L. guyanensis* ou *L. shawi* por kDNA, *L. braziliensis* por PCR-RFLP ITS1 e PCR *g6p* e como *L. naiffi* por PCR-RFLP *hsp70C*. Uma amostra (RB053) foi identificada como *L. braziliensis* ou *L. guyanensis* ou *L. shawi* por kDNA, como *L. naiffi* por ITS1 e como *L. braziliensis* por *hsp70C*; esta amostra só foi positiva na PCR *g6p* para o subgênero *L. (Viannia)*. A amostra RB004 foi identificada como *L. lainsoni* por PCR-RFLP *hsp70C* (Figura 4.10) e como não-*L. braziliensis* por PCR *g6p*, mas apresentou um perfil sugestivo de mistura entre *L. lainsoni* e *L. naiffi* para PCR-RFLP ITS1. A amostra RB013 apresentou perfil de *L. guyanensis* para PCR-RFLP ITS1 e PCR-RFLP *hsp70C*, mas foi positiva para todas as PCR *g6p*, ou seja, não sendo possível identificar esta amostra como sendo *L. braziliensis* ou não *L. braziliensis*.

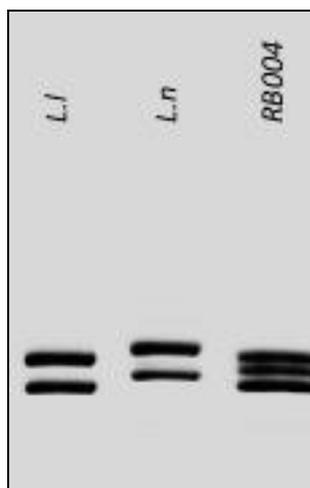


Figura 4.10: PCR-RFLP ITS1 após digestão com a enzima *Sau3AI* observado em gel de acrilamida 12,5%, corado pela prata. Os perfis apresentados correspondem as cepas de referência de *L. lainsoni* (*L.l*) e *L. naiffi* (*L.n*) e a uma amostra (RB004) de paciente com diagnóstico de leishmaniose que para este marcador apresentou um perfil misto entre as espécies citadas.

Considerando os resultados descritos anteriormente, aplicamos a PCR direcionada para ITS1 e também PCR *hsp70C* na detecção de DNA de *Leishmania* a partir de DNA extraído de fragmento de tecido de lesão cutânea de pacientes clinicamente diagnosticados com leishmaniose tegumentar e que foram apostos em lâminas (posteriormente coradas pelo Giemsa) e em papel de filtro. Vale ressaltar que o grupo de lâminas e de papel de filtro correspondem a grupo de pacientes distintos, provenientes de áreas endêmicas diferentes.

No caso das amostras de DNA extraídos de papel de filtro foram utilizadas amostras que já haviam sido utilizadas na PCR kDNA por outros laboratórios, sendo 67 positivas de um total de 77 amostras (Romero *et al.*, 2009). Destas, 76 foram usadas na PCR ITS1, pois uma amostra havia sido perdida, com 25 sendo positivas. No caso da PCR *hsp70C* escolhemos 21 amostras de DNA que apresentaram PCR positiva para kDNA e ITS1, mas nenhuma resultou em PCR positiva para este marcador (Tabela 4.6).

Tabela 4.6: Positividade das PCRs de kDNA, ITS1 e *hsp70C*, aplicadas em amostras de posições em papel de filtro.

Amostras	kDNA (n=77)	ITS1* (n=76)	<i>Hsp70 C</i> (n=21)
Positivos	67	25	0
Negativos	10	51	21

*Todas as amostras positivas foram submetidas a RFLP e identificadas como *L. braziliensis*.

N= número de amostras

Os métodos de PCR ITS1 e PCR *hsp70C* foram aplicados para detecção de DNA de *Leishmania* a partir de material de lâminas coradas pelo Giemsa que foram utilizadas na rotina do diagnóstico da LT em Rondônia (ou seja, diagnóstico parasitológico realizado na rotina do LACEN do estado). Foram utilizadas 123 amostras, todas submetidas a PCR kDNA e com resultado positivo (experimento realizado em outro laboratório). A sensibilidade de ambas as metodologias, PCR ITS1 e PCR *hsp70C*, foi muito baixa, ou seja, 4,8% para PCR ITS1 e 6,5% para PCR *hsp70C* (Tabela 4.7).

Tabela 4.7: Positividade das PCRs de ITS1 e *hsp70C*, aplicado as amostras de posições em lâminas coradas pelo método de Giemsa.

N=123	ITS1	<i>hsp70C</i>
positivos^a	6 (4,8%)	8 ^b (6,5%)
negativos	117	115

^a3 amostras foram concordantes na positividade para ITS1 e *hsp70C*

^b4 amostras foram identificadas ao nível específico através do sequenciamento do produto de PCR, sendo 2 *L. braziliensis* e 2 *L. amazonensis*.

5.DISCUSSÃO

O principal objetivo deste trabalho foi estabelecer um método baseado na PCR que possa ser aplicado no diagnóstico das leishmanioses, combinando boa sensibilidade e capacidade de diferenciação das espécies. Resultados anteriores do nosso grupo indicaram que regiões do gene *hsp70* poderiam ser utilizadas para o alcance deste objetivo. Analisando um fragmento de aproximadamente 1.400pb do gene *hsp70* de espécies de *Leishmania* foi possível verificar que todas as espécies que circulam no Brasil podem ser distinguidas através da análise das sequências correspondente a este gene e que o RFLP do fragmento amplificado pela PCR também é útil na discriminação destas espécies, esta região já havia sido utilizada em outros estudos e seu potencial em discriminar espécies de *Leishmania* já havia sido discutido (da Silva *et al.*, 2010). Além disso, a utilidade deste alvo para o diagnóstico molecular das leishmanioses havia sido apontada (Garcia *et al.*, 2004, 2007). O presente estudo, analisando um total de 70 cepas, confirmou a capacidade da PCR *hsp70* em discriminar espécies de *Leishmania* que estão associadas com a leishmaniose humana no Brasil, como proposto anteriormente (da Silva *et al.*, 2010). No entanto, por ser tratar de um fragmento grande do gene de *hsp70*, é esperado um baixo sucesso na amplificação de pequenas quantidades de DNA, como é o caso de amostras de DNA obtidas a partir de material clínico. De fato, o limite de detecção da PCR *hsp70* utilizando os iniciadores que amplificam um fragmento de 1.400pb foi alto, ou seja 20pg, que corresponde a cerca de 100 parasitas, indicando que esta metodologia não deve ser aplicada no diagnóstico molecular das leishmanioses.

Portanto, novos iniciadores foram desenhados visando a amplificação de fragmentos menores correspondendo a regiões do gene *hsp70* de *Leishmania*. Um total de sete iniciadores foram desenhados (4 “forward” e 3 “reverse”) e estes combinados de quatro formas distintas, visando a amplificação de fragmentos menores que correspondiam a quatro regiões distintas deste gene e que apresentavam polimorfismos espécie-específicos. Desta forma, foram avaliados quatro protocolos de PCR para amplificação de fragmentos correspondentes a regiões do gene *hsp70* de *Leishmania*, aqui nomeados de PCR *hsp70A*, *hsp70B*, *hsp70C* e *hsp70D*, comparando com outras metodologias que já são empregadas no

diagnóstico molecular das leishmanioses.

O diagnóstico definitivo da leishmaniose tegumentar pode ser um desafio, especialmente em áreas endêmicas onde outras doenças que apresentam sintomas clínicos semelhantes ocorrem. O diagnóstico “ouro” aceito envolve a visualização microscópica de formas amastigotas em fragmentos de tecidos obtidos do local da lesão e o isolamento de parasitas, mas, neste caso, a identificação do agente etiológico ao nível específico só é possível se o isolado obtido resultar em sucesso no cultivo (Reithinger *et al.*, 2007; Desjeux *et al.*, 2004; Herwaldt 1999). Sendo isto possível, várias metodologias podem ser utilizadas para a identificação da espécie e embora MLEE ainda seja considerada como o método-ouro, inúmeros métodos baseados na PCR tem sido descritos e utilizados para este fim (revisito Reithinger e Dujardin 2007).

Um dos grandes desafios tem sido desenvolver e/ou aplicar métodos que possuam boa sensibilidade para o diagnóstico molecular das leishmanioses e que ainda permitam a discriminação das espécies de *Leishmania*. Muitos métodos baseados na reação de PCR tem sido aplicados para esta finalidade usando diferentes alvos, como microssatélites, regiões do kDNA, sequências teloméricas, *gp63*, *hsp70*, miniexon, rRNA, entre outros genes (revisito por Reithinger e Dujardin 2007; Singh e Sivakumar 2003; Tavares *et al.*, 2003; Vega-Lopez 2003). Dentre estes métodos, análise de RFLP do produto amplificado por PCR tem apresentado resultados promissores, principalmente os métodos que tem como alvo genes multicópia (Garcia *et al.*, 2004; Marfurt *et al.*, 2003; Victoir *et al.*, 2003; Abdeen *et al.*, 2002; Mauricio *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2001; Cupolillo *et al.*, 1995; Guevara *et al.*, 1992). Muitos trabalhos tem utilizado o gene ribossômico para o diagnóstico molecular das leishmanioses, em muitos casos avaliando a capacidade de discriminação das espécies. Em casos de leishmaniose do Velho Mundo a amplificação da região ITS1 tem sido bastante utilizada e a PCR-RFLP empregando a enzima *HaeIII* se mostra eficiente para distinguir entre algumas das espécies de *Leishmania* (Schonian *et al.*, 2003). No entanto ainda não existe uma metodologia padrão para o diagnóstico parasitológico molecular das leishmanioses, estes variando muito de acordo com o grupo de pesquisadores que desenvolveu o trabalho. No Brasil, um levantamento feito através das publicações disponíveis no PubMed indica que a PCR direcionada para a amplificação da região conservada do minicírculo do kDNA é o método mais utilizado para o diagnóstico molecular das

leishmanioses, mas a PCR tendo como alvo o gene ribossômico (sejam os espaçadores internos transcritos ou a subunidade menor – SSU) também é bastante empregada e alguns trabalhos usando a PCR do gene *g6p* tem sido desenvolvidos (Castilho *et al.*, 2003).

Pelo exposto acima, optamos por avaliar metodologias visando a amplificação de regiões do gene *hsp70* por PCR (correspondendo a regiões de cerca de 230 – 380pb), desenvolvidas no presente estudo, comparando com outros métodos de PCR, usando os alvos kDNA, ITS1 e *g6p*. A PCR direcionada para estes alvos, combinada a RFLP ou não, foi avaliada quanto ao percentual de positividade, considerando o limite de detecção de DNA de promastigotas ou quando utilizada empregando DNA extraído a partir de material clínico. Para isto utilizamos DNA de promastigotas de cepa de referência para avaliarmos o limite de detecção de cada método. Os melhores resultados foram obtidos para PCR kDNA e a PCR *hsp70*, independente da região, apresentou esta mesma capacidade de detecção, melhor do que o que foi observado para PCR ITS1 e PCR *g6p*.

A PCR kDNA tem sido considerada como um excelente candidato para o diagnóstico molecular das leishmaniose justamente em função da sua ótima sensibilidade, uma vez que existem cerca de 10.000-20.000 minicírculos por célula de *Leishmania* (Simpson, 1973). No caso das regiões do gene ribossômico, estudos indicam uma sensibilidade de 1-10 parasitas (Odiwuor *et al.*, 2011; Schonian *et al.*, 2003; Meredith *et al.*, 1993), embora neste estudo a sensibilidade de ITS1 tenha sido menor, podendo este resultado estar relacionado, por exemplo, a uma possível degradação do DNA empregado, dificultando a amplificação de algumas partes do genoma. É estimado que existam 20 – 200 cópias do gene ribossômico no genoma de *Leishmania*, indicando que este é realmente um bom alvo para detectar pequenas quantidades do parasita. Estudos anteriores (Garcia *et al.*, 2004) indicaram uma sensibilidade de 3-30 parasitas pela PCR *hsp70* (que amplifica um fragmento de aproximadamente 1.400pb), um resultado muito bom para um gene de cópia única, como é este caso. Certamente o fato de termos desenhado iniciadores para amplificação de um fragmento menor aumentou a sensibilidade do alvo (Marfurt *et al.*, 2003), pois detectamos 2fg de DNA de *Leishmania* quando PCR *hsp70* (no caso, dos fragmentos menores) foi utilizada. Considerando que o limite de detecção para outros alvos de cópia múltipla, como o gene de mini-exon, tem sido reportado como sendo de 10-50 parasitas, consideramos que os resultados obtidos com *hsp70*

são bastante promissores. No caso da baixa sensibilidade observada para PCR *g6p*, nossos resultados estão de acordo com o que já havia sido relatado na literatura, embora saibamos que a sensibilidade da PCR usando este alvo pode melhorar quando métodos como PCR em tempo real são aplicados (Castilho *et al.*, 2003, 2008).

Empregando um painel de cepas de referência correspondentes às espécies de *Leishmania* que circulam no Brasil e que são patógenos humanos, avaliamos a capacidade das metodologias mencionadas acima em discriminar estas espécies através da PCR-RFLP, como exceção da PCR *g6p* cuja abordagem foi a de utilizar combinações de iniciadores distintos que permitem a separação de algumas espécies, como já descrito (Castilho *et al.*, 2003). Usando um painel de cinco enzimas de restrição foi possível identificar praticamente todas as espécies avaliadas quando realizamos a PCR-RFLP kDNA; a exceção foi *L. braziliensis* e *L. shawi*, que apresentaram o mesmo perfil para todas as enzimas. A PCR-RFLP ITS1 empregando a enzima *Sau3AI* gera exatamente os mesmos perfis que a enzima *HaeIII* (E. Cupolillo, dados não publicados) e que tem sido utilizada em vários estudos que empregam a PCR-RFLP ITS1 para o diagnóstico das leishmanioses (Hajjarian *et al.*, 2011; Gelanew *et al.*, 2010; Nasereddin *et al.*, 2008; Schonian *et al.*, 2003). Como já apontado em outros estudos, a diferença entre *L. braziliensis* e *L. guyanensis* não é detectada facilmente, embora exista diferença nesta região entre as sequências destas espécies, como pode ser observado analisando sequências disponíveis em bancos de dados públicos. Por isso optamos por utilizar uma eletroforese em gel de alta resolução, que permite resolver diferenças de tamanho de fragmento de pelo menos 4pb e de fato a diferença entre estas duas espécies foi observada.

Com relação aos protocolos avaliados para a amplificação do gene *hsp70*, os protocolos PCR *hsp70B* e PCR *hsp70D* não apresentaram bons resultados quanto a capacidade em discriminar as espécies testadas. Os protocolos PCR *hsp70A* e PCR *hsp70C* apresentaram os melhores resultados, sendo estes idênticos, considerando a combinação do limite de detecção e capacidade de discriminação das espécies. A distinção entre as espécies determinada pela RFLP foi confirmada pela análise das sequências referente a região amplificada pela PCR *hsp70C*, demonstrando polimorfismos entre as espécies. Portanto, escolhemos o protocolo PCR *hsp70C* para ser utilizado nos demais ensaios de PCR-RFLP, empregando DNA de

promastigotas e também extraído de tecidos, preservado de diversas formas, de animais experimentais ou pacientes infectados com *Leishmania* spp, como será discutido adiante.

Considerando então os resultados obtidos para cada uma das metodologias testadas, partimos para etapa de validação destas metodologias quanto ao poder de discriminação das espécies. Para isso utilizamos um total de 70 cepas de *Leishmania*, correspondendo as espécies que já haviam sido avaliadas representadas pelas suas cepas de referência. A distinção entre *L. braziliensis* ou *L. shawi* e *L. guyanensis* não se repetiu quando este painel de cepas foi utilizado nos ensaios de PCR-RFLP kDNA. Certamente a variabilidade de classes de minicírculos (Brewster e Barker 2002) dificulta o uso da PCR-RFLP do kDNA para identificação de espécies de *Leishmania* e a reprodutibilidade dos perfis observados. Por isso, embora a sensibilidade desta PCR seja bastante elevada, indicando seu uso para o diagnóstico parasitológico molecular das leishmanioses, como já apresentado em diversos estudos (Azmi *et al.*, 2011; Kobets *et al.*, 2010, Ampuero *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2008), não achamos pertinente utilizar esta metodologia com o propósito de identificar espécies como proposto anteriormente (Volpini *et al.*, 2004). Além disso é importante mencionar que a avaliação apenas de cepas de referência pode conduzir a resultados que não são reprodutíveis quando outras cepas são utilizadas.

Tanto a PCR-RFLP ITS1 quanto a PCR-RFLP *hsp70C* e a PCR-*g6p* apresentaram ótimos resultados quanto a reprodutibilidade dos perfis esperados para as demais cepas ensaiadas, considerando a identificação já realizada por MLEE. No entanto, algumas exceções foram observadas. Algumas cepas identificadas como *L. braziliensis* por MLEE, mas que representam variantes enzimáticas desta espécie (ou seja, não apresentaram perfil idêntico ao da cepa de referência) foram identificadas como outras espécies do subgênero *L. (Viannia)* por pelo menos um dos marcadores testados. Uma cepa foi identificada como *L. guyanensis* por PCR-RFLP ITS1 e como não-*L. braziliensis* por PCR *g6p*, embora tenha sido identificada como *L. braziliensis* por MLEE e pelas PCRs direcionadas para regiões do gene *hsp70*. Outras duas cepas identificadas como *L. braziliensis* por MLEE e por PCR-RFLP ITS1, apresentaram um perfil de não-*L. braziliensis* para PCR-*g6p* e de *L. naiffi* para PCR-RFLP *hsp70* (1.400pb), enquanto outras duas cepas que haviam sido identificadas como *L. braziliensis* por MLEE, resultado este

corroborado por PCR-RFLP ITS1, PCR-*g6p* e PCR-RFLP *hsp70C*, apresentaram perfil de *L. naiffi* para PCR-RFLP *hsp70* (1.400pb). As cepas identificadas como *L. braziliensis* por MLEE e que apresentaram perfil de não *L. braziliensis* para PCR-*g6p* apresentam perfil de eletromorfos atípicos para enzima *g6pDH*, ou seja, diferente do que é observado para a cepa de referência e a grande maioria de cepas identificadas como *L. braziliensis*.

As espécies classificadas no subgênero *L. (Viannia)* apresentam uma alta similaridade genética (Cupolillo *et al.*, 1995, 1997, 2000), compartilhando, por exemplo, epítotos (Amaral *et al.*, 1996) e sequências de DNA correspondentes a diversos genes, sendo *L. lainsoni* e *L. naiffi* as espécies mais divergentes, embora esta última seja apontada como uma espécie próxima a *L. braziliensis* em muitos estudos (Fraga *et al.*, 2010). Além disso, sabe-se que populações naturais de *Leishmania* podem apresentar mecanismos de recombinação genética (Rougeron *et al.*, 2010) e que, por isso, algumas cepas podem apresentar perfil de uma espécie para um determinado marcador e de outra para outro marcador (Almeida *et al.*, 2011). Por exemplo, uma cepa identificada como híbrido entre *L. naiffi* e *L. lainsoni* por eletroforese de enzimas foi identificada como *L. lainsoni* pela análise do gene de *hsp70* (da Silva *et al.*, 2010; Tojal da Silva *et al.*, 2006). Portanto, é de se esperar que a identidade de cepas de *Leishmania* ao nível específico possa, em alguns casos, variar em função do marcador utilizado.

A partir dos resultados do percentual de positividade e da validação dos diferentes métodos em discriminar espécies de *Leishmania*, escolhemos os alvos kDNA, ITS1, *g6p* e *hsp70C* para avaliarmos o potencial destes métodos para o diagnóstico parasitológico molecular das leishmanioses com identificação da espécie causal da infecção. Sabe-se que altas concentrações de DNA podem afetar o sucesso de uma reação de PCR. Quando trabalhamos com DNA extraído a partir de material clínico a quantidade de DNA do paciente é muito maior do que a de *Leishmania* e, por isso, é fundamental determinar qual é o limite máximo de DNA que pode ser utilizado em cada reação de PCR. Embora não tenha sido avaliado o efeito de várias concentrações de DNA humano no sucesso da PCR, observamos que quantidades iguais ou superiores a 20ng influenciaram negativamente a PCR, impedindo a amplificação do DNA alvo. Por isso, para realização das reações de PCR empregando DNA extraído de tecido de animais de laboratórios ou de humanos utilizamos uma quantidade de 200pg de DNA total em cada reação de

PCR.

A primeira avaliação foi realizada empregando DNA extraído de tecido de animais experimentalmente infectados com diversas espécies de *Leishmania*. Vários estudos discutem a utilidade de lâminas e papel de filtro impregnados com tecidos coletados das áreas afetadas pela infecção por *Leishmania* (Ghasemian *et al.*, 2011; Boggild *et al.*, 2010; Khatri *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2001,) e por isso avaliamos os marcadores apresentados neste estudo empregando DNA extraído de tecido congelado, bem como de lâminas e papel de filtro impregnados com estes tecidos. A melhor acurácia diagnóstica foi observada quando o DNA utilizado foi extraído de tecido congelado, com melhores resultados sendo observados para PCR kDNA e PCR *hsp70C*. Os resultados obtidos pelas PCR ITS1 e PCR *hsp70C* também não foram bons quando o DNA empregado nas reações foi extraído de lâminas coradas com Giemsa, embora tenha sido melhor para PCR *hsp70C* do que para PCR ITS1. Considerando que neste caso só foram analisados DNAs que já haviam sido utilizados em reações de PCR kDNA e todos tinham apresentado resultado positivo, acreditamos que uma segunda rodada de PCR, assim como mencionado acima, pode melhorar estes resultados (Schonian *et al.*, 2003). De fato, recentemente realizamos novas reações de PCR ITS1 usando o produto da primeira amplificação como DNA alvo e todos as amostras testadas foram positivas (C. Aprigio, G.C. Graça e E. Cupolillo, resultados não publicados). De qualquer forma, estudos anteriores indicaram melhor sucesso nas amplificações por PCR quando o DNA alvo foi extraído de papel de filtro do que de lâminas. Além disso, lâminas coradas produziram resultados piores dos que lâminas não coradas (Schonian *et al.*, 2003).

Embora alguns estudos indiquem que as lâminas utilizadas para o diagnóstico parasitológico das leishmanioses sejam boa fonte de DNA para serem utilizados no diagnóstico molecular desta doença, apresentando resultados excelentes, por exemplo, no caso de infecções por *L. tropica* (Ghasemian *et al.*, 2011; Khatri *et al.*, 2009), outros apontam que os resultados são de fato muito bons (Schonian *et al.*, 2003). No entanto, é interessante mencionar que a visualização de amastigotas em tecidos apostos em lâminas e corados pelo Giemsa é um dos métodos mais utilizados para o diagnóstico parasitológico das leishmanioses. Assim como em outros estudos (Pandey *et al.*, 2010; Alam *et al.*, 2009; Brustoloni *et al.*, 2007; Motazedian *et al.*, 2002), observamos PCR positiva quando utilizamos DNA

extraído de lâminas que não apresentaram indicativo de infecção, corroborando que o diagnóstico realizado pela visualização de amastigotas em tecidos corados com Giemsa apresenta uma série de limitações que prejudica o diagnóstico (Al-Jawabreh *et al.*, 2006).

Raspados e aspirados das lesões são dois dos espécimes clínicos mais comumente obtidos para o diagnóstico da LC por PCR. PCR empregando DNA extraído de papel de filtro inoculados com fragmentos de tecidos retirados do local da lesão tem se mostrado como um bom instrumento para a detecção de DNA de *Leishmania*, apresentando uma excelente performance quando o alvo utilizado foi o kDNA (Boggild *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2001), mas esta performance não foi alcançada com PCRs direcionadas para regiões como ITS1 (Romero *et al.*, 2009), cisteína proteinase B (*Cpb*), *hsp70* e manose fosfato isomerase (MPI) (Boggild *et al.*, 2010). O método empregando DNA extraído de papel de filtro é simples, relativamente barato, permite o fácil transporte de amostra e é adequado para condições de campo (Marques *et al.*, 2001) e por isso foi avaliado neste estudo. No entanto, os resultados obtidos com papel de filtro no presente trabalho não foram satisfatórios. Acreditamos que os resultados negativos obtidos para ITS1 e para *hsp70C* podem refletir problemas de degradação do DNA em função do armazenamento. Não sabemos precisar o tempo entre as realizações de cada PCR, mas sabemos que a PCR kDNA foi realizada logo após a extração do DNA e que a PCR ITS1 foi realizada com este mesmo DNA, que já estava armazenado há cerca de dois anos; a PCR *hsp70C* foi realizada ainda depois. Portanto, acreditamos que ensaios com DNA extraído de material coletado em papel de filtro devam ser repetidos com estes marcadores, tomando cuidado com o tempo de armazenamento do DNA entre os experimentos. Basiye *et al.*, 2011 demonstraram que dentre vários métodos utilizados para preservação de DNA de *Leishmania*, o uso de papel de filtro não apresentou um bom resultado. Além disso, como já demonstrado em outros estudos (Schonian *et al.*, 2003), pode ser interessante testar a realização de uma segunda rodada de PCR usando como DNA alvo o produto da primeira amplificação.

Finalmente, selecionamos DNAs extraídos de tecidos congelados que correspondiam a fragmentos das lesões de pacientes que haviam sido diagnosticados clínica e/ou parasitologicamente com leishmaniose cutânea. Neste caso os melhores resultados foram observados para PCR kDNA, seguido de, em

ordem decrescente em termos de sensibilidade, PCR ITS1, PCR *hsp70C* e PCR *g6p*, sendo que esta última apresentou um nível de sensibilidade muito ruim, menor do 50%, corroborando os resultados discutidos acima que mostraram um limite de detecção alto para esta metodologia. Uma melhor performance para a PCR kDNA, comparado com PCR ITS1 também foi observada em estudo anterior (Azmi *et al.*, 2011; Bensoussan *et al.*, 2006). É importante mencionar que a acurácia diagnóstica de cada método avaliado foi melhor para PCR *hsp70C* do que para PCR ITS1, considerando a PCR kDNA como o método-ouro, indicando que tanto PCR ITS1 quanto a PCR *hsp70C* são úteis para o diagnóstico molecular das leishmanioses. A concordância entre PCR-ITS1 e PCR-*hsp70C* foi baixa, indicando que estas metodologias podem ser complementares. Vários estudos comparando métodos baseados na PCR para o diagnóstico molecular das leishmanioses mostram baixa concordância entre diferentes métodos quando aplicados à mesma amostra (Azmi *et al.*, 2011; Marfurt *et al.*, 2003;). No que diz respeito à amplificação de fragmentos de DNA por PCR ITS1 e PCR *hsp70C*, a concordância entre esses genes foi cerca de 15%, uma vez que nem todas as amostras foram amplificadas por ambos os marcadores moleculares. Das 99 amostras de DNA, a amplificação de fragmentos correspondentes a ITS1 e *hsp70C* foi observada em 63 amostras; 19 amostras foram positivas apenas para PCR ITS1 e 10 apenas para PCR *hsp70C*. A causa dessa diferença ainda não é conhecida, mas também é frequente no caso da PCR aplicada ao diagnóstico molecular de outros parasitas (Gelanew *et al.*, 2007, Lalle *et al.*, 2009). Apesar do fato de que os iniciadores sejam desenhados para anelar em regiões conservadas, é possível que em alguns casos não exista um anelamento perfeito de toda a sequência do iniciador com o DNA alvo, prejudicando o sucesso de amplificação nas reações de PCR. Além disso, a presença de outros microrganismos, como fungos e bactérias, em uma lesão diagnosticada como leishmaniose é frequente (Markle *et al.*, 2004; Vera *et al.*, 2001, Edrissian *et al.*, 1990). Alguns iniciadores podem apresentar alguma similaridade com sequências de DNA destes microrganismos e isso certamente prejudicará o resultado final da reação de PCR.

Os resultados reforçaram a capacidade discriminativa de cada método avaliado, além de terem sido concordantes em quase todos os casos. Como esperado, os melhores resultados foram obtidos por PCR-RFLP ITS1 e PCR-RFLP *hsp70C*, já que estas metodologias permitem identificar o agente etiológico ao nível

específico. Apenas cinco amostras apresentaram resultados discordantes entre PCR ITS1, PCR *hsp70C* e PCR *g6p*. Duas foram identificadas como *L. braziliensis* por PCR ITS1 e PCR *g6p*, mas como *L. naiffi* por PCR *hsp70C*; uma amostra identificada como *L. naiffi* por PCR ITS1 foi identificada como *L. braziliensis* por PCR *hsp70*. Duas amostras que também apresentaram resultados discordantes são interessantes pelo fato de que temos os parasitas isolados destes pacientes e estes terem sido identificados por MLEE. A amostra RB004, identificada como híbrido entre *L. lainsoni* e *L. naiffi* (Tojal da Silva *et al.*, 2006) por MLEE, foi identificada como *L. lainsoni* por PCR-RFLP *hsp70C*, mas apresentou um perfil sugestivo de mistura entre *L. lainsoni* e *L. naiffi* para PCR-RFLP ITS1, corroborando o resultado de MLEE; a amostra RB013, identificada como uma variante genética de *L. guyanensis* por MLEE, foi positiva para todas as PCR *g6p*, ou seja, não sendo possível identificar esta amostra como sendo *L. braziliensis* ou não *L. braziliensis*, embora tenha apresentado perfil de *L. guyanensis* para PCR-RFLP ITS1 e PCR-RFLP *hsp70C*. Comentários acerca da discordância entre as identificações obtidas pelos diferentes métodos já foram feitos acima, embora no caso de material clínico não podemos excluir a possibilidade de infecções mistas (Camara Coelho *et al.*, 2011) e que, neste caso, um marcador pode amplificar preferencialmente o DNA de uma espécie enquanto outro marcador o de outra.

A definição de espécie em *Leishmania* é certamente um aspecto que precisa ser considerado para compreender os casos onde houve discordância entre os resultados obtidos pelos diferentes marcadores com relação a identificação taxonômica. O conceito biológico de espécie não pode ser aplicado em *Leishmania* e não existe nenhuma definição dos limites de espécies dentro deste gênero (Schonian *et al.*, 2010; Banuls *et al.*, 1999) e por isso nenhum sistema de genotipagem pode servir como padrão-ouro para a identificação de uma determinada espécie, sendo sempre importante a combinação de diferentes métodos. No entanto, isso se torna inviável e talvez desnecessário quando o objetivo é combinar o diagnóstico molecular à identificação do agente etiológico, visando auxiliar na vigilância epidemiológica, no prognóstico e na definição de esquemas terapêuticos. Embora a PCR-RFLP ITS1 tenha apresentado bons resultados e outros estudos demonstrarem uma excelente performance para identificação de espécies de *Leishmania* que circulam em áreas do Velho Mundo (Shahbazi *et al.*, 2008; Bensoussan *et al.*, 2006; Schonian *et al.*, 2003), o fato de só ser possível

distinguir entre *L. braziliensis* e *L. guyanensis* quando se utiliza uma eletroforese em gel de alta resolução ou o sequenciamento limita um pouco o seu uso em áreas de ocorrência destas espécies. A PCR-RFLP *hsp70C*, direcionada para a amplificação de uma região do gene *hsp70* de *Leishmania*, combina boa sensibilidade para detectar *Leishmania* diretamente em material clínico e a habilidade em identificar todas as espécies que circulam no Brasil, sendo útil principalmente em áreas onde existe a ocorrência de mais de uma espécie.

6.CONCLUSÃO

- ✚ A PCR direcionada para a amplificação da região conservada dos minicírculos do kDNA de *Leishmania*, assim como para regiões dos genes que codificam para a proteína hsp70, com tamanhos variando entre cerca de 230-380 pares de base, foram as que detectaram uma menor quantidade de DNA extraído de formas promastigotas de *Leishmania*.
- ✚ Foram desenvolvidos quatro ensaios de PCR distintos, visando a amplificação de quatro regiões dos genes que codificam para a proteína hsp70 de *Leishmania*. Todos os ensaios apresentaram excelente limite de detecção, com resultados positivos quando concentrações baixas de DNA extraído de formas promastigotas de *Leishmania* foram utilizadas. A capacidade de amplificar DNA de *Leishmania* destes alvos foi muito maior do que a observada para a PCR direcionada para amplificação de uma região maior de gene hsp70, correspondente a 1.400 pares de base.
- ✚ Analisando apenas cepas de referência de espécies de *Leishmania* patógenos humanos que circulam no Brasil foi possível observar que a PCR-RFLP do kDNA não permite distinguir entre todas as espécies, enquanto a PCR-RFLP dos alvos ITS1, hsp70 1.400pb, hsp70A e hsp70C possibilita a identificação de todas as espécies analisadas, embora no caso de ITS1 seja necessário a realização de uma eletroforese em gel de alta resolução.
- ✚ A análise de um painel representativo de cepas de *Leishmania* indicaram que a PCR-RFLP do kDNA não permite a distinção de três espécies analisadas. Com relação a PCR-RFLP ITS1, PCR-RFLP hsp70 1.400pb e PCR-RFLP hsp70C, os resultados obtidos referentes a identificação de espécies de *Leishmania* empregando cepas de referência foram repetidos quando outras cepas foram analisadas. A aplicabilidade da PCR-RFLP ITS1 e PCR-RFLP hsp70C na identificação destas espécies foi confirmada realizando estas metodologias empregando DNA extraído de material clínico.

- ✚ A PCR direcionada para a amplificação da região conservada dos minicírculos do kDNA de *Leishmania* apresentou excelente percentual de positividade, indicando seu uso para o diagnóstico molecular das leishmanioses, enquanto a PCR *g6p* tem baixo percentual de positividade para ser utilizada com esta finalidade. Embora o percentual de positividade foi menor para PCR ITS1 e PCR *hsp70C*, comparando com PCR kDNA, os valores obtidos foram suficientemente bons para indicar o uso destas metodologias no diagnóstico da doença.
- ✚ O conjunto de resultados indica que a PCR-RFLP ITS1 e a PCR-RFLP *hsp70C* são as metodologias mais indicadas quando pretende-se combinar a capacidade de diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania*. No entanto, a dificuldade da PCR-RFLP ITS1 em identificar algumas espécies limita seu uso, indicando que a PCR-RFLP *hsp70C*, desenvolvida neste estudo, direcionada para a amplificação de um fragmento do gene *hsp70* de *Leishmania*, é a metodologia que melhor se aplica ao diagnóstico molecular das leishmanioses com definição da espécie de *Leishmania* associada a infecção.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdeen ZA, Sawalha SS, Eisenberger CL, Khanfar HM, Greenblatt CL, Yousef O, Schnur LF, Azmi K, Warburg A, Bader KA, Jaffe CL, Baneth G. Epidemiology of visceral leishmaniasis in the Jenin District, West Bank: 1989-1998. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(4):329-33.

Alam MZ, Kovalenko DA, Kuhls K, Nasyrova RM, Ponomareva VI, Fatullaeva AA, Razakov SA, Schnur LF, Schönian G. Identification of the agent causing visceral leishmaniasis in Uzbeki and Tajiki foci by analysing parasite DNA extracted from patients' Giemsa-stained tissue preparations. *Parasitology.* 2009 ;136(9):981-6.

Al-Jawabreh A, Schnur LF, Nasereddin A, Schwenkenbecher JM, Abdeen Z, Barghuthy F, Khanfar H, Presber W, Schönian G. The recent emergence of *Leishmania tropica* in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of *L. major*. *Trop Med Int Health.* 2004 ; 9(7):812-6.

Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarsheh O, Presber W. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. *Acta Trop.* 2006 ;99(1):55-61.

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 the rRNA Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2). *J Clin Microbiol.* 2011.

Alvar, J., C. Canavate, B. Gutierrez-Solar, M. Jimenez, F. Laguna, R. Lopez-Velez, R. Molina, and J. Moreno. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.*1997; 10:298–319.

Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J and Nieto J. Canine leishmaniasis, *Adv. Parasitol.* 2004; 57:1–88.

Ampuero J, Rios AP, Carranza-Tamayo CO, Romero GA. Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localised cutaneous

leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 ; 104(7):992-7.

Arevalo J, Ramirez L, Aduai V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verastegui C, Lazo M, Loayza-Muro R, De Doncker S, Maurer A, Chappuis F, Dujardin JC, and Llanos-Cuentas A. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. Journal of Infectious Diseases 2007, 195: 1846-1851.

Ashford R W, Desjeux P, deRaadt P. Estimation of population at risk of infection with leishmaniasis. Immunol Today. 1991;**8**:104–105.

Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, and Harris E: PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: A comparison with classical diagnostic methods. Journal of Parasitology 1999, 85: 181-187.

Azmi K, Nasereddin A, Ereqat S, Schnur L, Schonian G, Abdeen Z. Methods incorporating a polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism and their use as a 'gold standard' in diagnosing Old World cutaneous leishmaniasis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011.

Banuls, A. L., Hide, M. and Tibayrenc, M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. International Journal for Parasitology.1999; 29: 1137–1147.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. Am J Trop Med Hyg. 1991 May;44(5):536-46.

Basiye FL, Schoone GJ, Beld M, Minnaar R, Ngeranwa JN, Wasunna MK, Schallig HD. Comparison of short-term and long-term protocols for stabilization and preservation of RNA and DNA of *Leishmania*, *Trypanosoma*, and *Plasmodium*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011 ;69(1):66-73.

Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2006 ;44(4):1435-9.

Boggild AK, Valencia BM, Espinosa D, Veland N, Ramos AP, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, Low DE. Detection and species identification of *Leishmania* DNA from filter paper lesion impressions for patients with American cutaneous leishmaniasis. Clin Infect Dis. 2010 ; 1;50(1):1-6.

Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. Exp Parasitol. 1996 ;84(2):188-94.

Botilde Y, Laurent T, Tintaya WQ, Chincharro C, Canavate C, Cruz I, Kuhls K, Schonian G, Dujardin JC. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. Infect. Genet. Evol. 2006;6:440-446.

Brewster S and Barker DC. Analysis of minicircle classes in *Leishmania (Viannia)* species. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002 Apr;96 Suppl 1:S55-63.

Brito ME, Andrade MS, Mendonça MG, Silva CJ, Almeida EL, Lima BS, Félix SM, Abath FG, da Graça GC, Porrozzini R, Ishikawa EA, Shaw JJ, Cupolillo E, Brandão-Filho SP. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. Trop Med Int Health. 2009 ;14(10):1278-86.

Brustoloni YM, Lima RB, da Cunha RV, Dorval ME, Oshiro ET, de Oliveira AL, Pirmez C. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 ;102(4):497-500.

Camara Coelho LI, Paes M, Guerra JA, Barbosa MG, Coelho C, Lima B, Brito ME, Brandão Filho SP. Characterization of *Leishmania spp.* causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. Parasitol Res. 2011 ;108(3):671-7.

Camera PO, Junger J, Pires F, Mattos M, Oliveira Neto MP, Fernandes O, Pirmez C. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene ^{JCR}, 2006; 100(12):1112-1117.

Capelli G, Baldelli R, Ferroglio E, Genchi C, Gradoni L, Gramiccia M, Maroli M, Mortarino M, Pietrobelli M, Rossi L and Ruggiero M. Monitoring of canine leishmaniasis in northern Italy: an update from a scientific network. Parassitologia. 2004; 46: 193–197.

Castilho TM, Shaw JJ, and Floeter-Winter LM: New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. Journal of Clinical Microbiology 2003, 41: 540-546.

Castilho TM, Camargo LM, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Am J Trop Med Hyg. 2008 ;78(1):122-32.

Cota GF, de Sousa MR, Rabello A. Predictors of Visceral Leishmaniasis Relapse in HIV-Infected Patients: A Systematic Review. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(6):e1153.

Cupolillo E, Grimaldi G, and Momen H: A General Classification of New-World *Leishmania* Using Numerical Zymotaxonomy. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1994, 50: 296-311.

Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H, Beverley SM. Intergenic Region Typing (Irt)-a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. Mol. Biochem. Parasitol. 1995;73:145-155.

Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. Genetic diversity among *Leishmania (Viannia)* parasites. Ann Trop Med Parasitol. 1997 ;91(6):617-26.

Cupolillo E, Momen H, and Grimaldi G: Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 1998, 93: 663-668.

Cupolillo E. and Momen H. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000 ;95(4):583-8.

da Silva LA, de Sousa C dos S, da Graça GC, Porrozzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. Infect Genet Evol. 2010;10(1):77-83.

Deane LM and Grimaldi G Jr. Leishmaniasis in Brazil. In : Chag KP, Bray RS eds *Leishmaniasis. Amsterdam: Elsevier Sci Publ.* 1985; 14: 247-281.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004; 27(5):305-18.

Disch J, Pedras MJ, Orsini M, Pirmez C, de Oliveira MC, Castro M, Rabello A. *Leishmania (Viannia)* subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005; 51(3):185-90.

Dujardin JC. Risk factors in the spread of leishmaniases: towards integrated monitoring? *Trends in Parasitology.* 2006;22:4-6.

Edrissian GH, Mohammadi M, Kanani A, Afshar A, Hafezi R, Ghorbani M, Gharagozloo AR. Bacterial infections in suspected cutaneous leishmaniasis lesions. Bull World Health Organ. 1990;68(4):473-7.

Eisenberger, C. L., & Jaffe, C. L. *Leishmania*: identification of Old World species using a permissively primed intergenic polymorphic polymerase chain reaction. *Exp Parasitol* 1991;91: 70–77.

Feldsine P, Abeyta C, Andrews WH. AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. J AOAC Int 2002; 85(5):1187-200.

Fraga J, Montavalo AM, Doncker SD, Dujardin JC, Auwera GV. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. Infection, Genetics and Evolution. 2010,10:238-245.

Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Tintaya KWQ, and Dujardin JC: Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *Journal of Clinical Microbiology* 2004, 42: 2294-2297.

Garcia AL, Parrado R, De Doncker S, Bermudez H, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007 ;101(4):368-71.

Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò SM. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. . *Acta Trop.* 2007 ;102(2):92-9.

Gelanew T, Amogne W, Abebe T, Kuhls K, Hailu A, Schönian GA clinical isolate of *Leishmania donovani* with ITS1 sequence polymorphism as a cause of para-kala-azar dermal leishmaniasis in an Ethiopian human immunodeficiency virus-positive patient on highly active antiretroviral therapy. *Br J Dermatol.* 2010 ;163(4):870-4.

Ghasemian M, Maraghi S, Samarbafzadeh AR, Jelowdar A, Kalantari M. The PCR-based detection and identification of the parasites causing human cutaneous leishmaniasis in the Iranian city of Ahvaz. *Ann Trop Med Parasitol.* 2011 ;105(3):209-15.

Gontijo CM, Pacheco RS, Orefice F, Lasmar E, Silva ES, Melo MN. Concurrent cutaneous, visceral and ocular leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a kidney transplant patient. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002 ; 97(5):751-3.

Gontijo C.M.F and Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas, *Rev. Bras. Epidemiol.* 2004;7: 338–347.

Grimaldi G Jr; Tesh RB & McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of *Leishmaniasis* in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1989; 41: 687-725.

Grimaldi G, Momen H, Naiff RD, McMahonpratt D, Brarrett TV. Characterization and classification of leishmania parasites from humans, wild mammals, and sand flies into Amazon region of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991;44:645-661.

Grimaldi GJr and Tesh RB. *Leishmaniasis* of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews* 1993; 6: 230-250.

Guerra JA, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI, Gama P, Moura A, Amato V, Barbosa MG, Ferreira LC. Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 ; 8;5(3):e980.

Guevara P, Alonso G, da Silveira JF, de Mello M, Scorza JV, Añez N, Ramírez JL. Identification of new world *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. *Mol Biochem Parasitol.* 1992 ;56(1):15-26.

Hajjaran H, Vasigheh F, Mohebbali M, Rezaei S, Mamishi S, Charedar S. Direct diagnosis of *Leishmania* species on serosity materials punctured from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP. *J Clin Lab Anal.* 2011;25(1):20-4.

Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(7):1989-95.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999 ; 2;354(9185):1191-9

Hoorfar J, Cook N, Malorny B, Wagner M, De Medici D, Abdulmawjood A. Letter to the editor. *Lett Appl Microbiol* 2002; 38 (2):79-80.

Jacobson, R. L., Eisenberger, C. L., Svobodova, M., Baneth, G., Sztern, J., Carvalho, J., Nasereddin, A., El Fari, M., Shalom, U., Volf, P., Votypka, J., Dedet, J. P., Pratlong, F., Schönian, G., Schnur, L. F., Jaffe, C. L. and Warburg, A. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in northern Israel. *The Journal of Infectious Diseases.* 2003; 188: 1065–1073.

Karunaweera, N. D., Pratlong, F., Siriwardane, H. V., Ihalamulla, R. L. and Dedet, J. P. Sri Lankan cutaneous leishmaniasis is caused by *Leishmania donovani* zymodeme MON-37. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2003; 97: 380–381.

Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopiña M, Marco JD, Barroso PA, Gomez EA, Mimori T, Korenaga M, Iwata H, Nonaka S, Hashiguchi Y. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 ;72(1):87-93.

Khatri ML, Di Muccio T, Gramiccia M. Cutaneous leishmaniasis in North-Western Yemen: a clinicoepidemiologic study and *Leishmania* species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *J Am Acad Dermatol.* 2009 ;61(4):e15-21.

Kobets T, Badalová J, Grekov I, Havelková H, Svobodová M, Lipoldová M. *Leishmania* parasite detection and quantification using PCR-ELISA. *Nat Protoc.* 2010;5(6):1074-80.

Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GE, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA, Schönian G. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(6):e1155.

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; 40(1):210-5.

Lainson R and Shaw JJ . Evolution, classification and geographical distribution. Peters, W; Killick-Kendrick, R, eds. *The Leishmaniasis in Biology and Epidemiology.* , Academic Press London; 1987, 1-120.

Lalle M, Bruschi F, Castagna B, Campa M, Pozio E, Cacciò SM. High genetic polymorphism among *Giardia duodenalis* isolates from Sahrawi children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009 ;103(8):834-8.

Malorny B, Tassios PT, Radstrom P, Cook N, Wagner M, and Hoorfar J: Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 2003, 83: 39-48.

Manual de Leishmaniose Visceral Grave . Ministério da Saúde: Secretária de Vigilância em Saúde. 2006.

Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde: Secretária de Vigilância em Saúde. 2010; 2.

Marfurt J, Niederwiese I, Divine MN, Beck HP, Felger I . Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. Diagnostic Microbiology and Infection Disease 2003; 46:115-124.

Markle WH, Makhoul K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. Am Fam Physician. 2004;69(6):1455-60.

Marques MJ, Volpini AC, Genaro O, Mayrink W, and Romanha AJ: Simple form of clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2001; 65: 902-906.

Marsden PD, Lessa HA, Oliveira MR, Romero GA, Marotti JG, Sampaio RN, Barral A, Carvalho EM, Cuba CC, Magalhães AV, Macêdo VO. Clinical observations of unresponsive mucosal leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1998; 59(4):543-5.

Mauricio IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles MA. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. Parasitology. 2001;122(Pt 4):393-403.

Meredith SE, Zijlstra EE, Schoone GJ, Kroon CC, van Eys GJ, Schaeffer KU, el-Hassan AM, Lawyer PG. Development and application of the polymerase chain reaction for the detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical material. Arch Inst Pasteur Tunis. 1993 ;70(3-4):419-31.

Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. Acta Trop. 2011; 119(23):6975.

Morales MA, Chicharro C, Ares M, Cañavate C, Barker DC, Alvar J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95(1):104-7.

Motazedian H, Karamian M, Noyes HA, Ardehali S. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 96: 31–34.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005; 366:1561-77.

Nasereddin, A, Baneth, G, Schönian, G, Kanaan, M and Jaffe CL. Molecular fingerprinting of *Leishmania infantum* strains following an outbreak of visceral leishmaniasis in central Israel. *Journal of Clinical Microbiology.* 2005; 43: 6054–6059.

Nasereddin A, Bensoussan-Hermano E, Schönian G, Baneth G, Jaffe CL. Molecular diagnosis of Old World cutaneous leishmaniasis and species identification by use of a reverse line blot hybridization assay. *J Clin Microbiol.* 2008 ;46(9):2848-55.

Noyes, H., Pratlong, F., Chance, M., Ellis, J., Lanotte, G. and Dedet, J. P. A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus *Leishmania* ssp. *Parasitology.* 2002; 124: 17–24.

Odiwuor SO, Saad AA, De Doncker S, Maes I, Laurent T, El Safi S, Mbuchi M, Büscher P, Dujardin JC, Van der Auwera G. Universal PCR assays for the differential detection of all Old World *Leishmania* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011 ;30(2):209-18.

Oliveira Neto M.P. Leishmaniose Tegumentar no Estado do Rio de Janeiro: estudo de 648 casos observados no Hospital Evandro Chagas - Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz. 1998. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro. 1998.

Pandey K, Pandey BD, Mallik AK, Kaneko O, Uemura H, Kanbara H, Yanagi T, Hirayama K. Diagnosis of visceral leishmaniasis by polymerase chain reaction of DNA extracted from Giemsa's solution-stained slides. *Parasitol Res.* 2010 ;107(3):727-30.

Pereira Ede F, Thomaz-Soccol V, Lima HC, Thomaz-Soccol A, de Castro EA, Mulinari-Brenner F, Queiroz-Telles F, Luz E. Molecular diagnosis of leishmaniosis in the Paraná state of southern Brazil. *Exp Dermatol.* 2008 Dec17(12):1024-30.

Piarroux R, Azaiez R, Lossi AM, Reynier P, Muscatelli F, Gambarelli F, Fontes M, Dumon H, Quilici M. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 ;49(3):364-9.

Ramírez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D, Velez ID. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(10):3768-73.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Simon Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:581–96.

Reithinger R and Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis:Current status and future applications. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45:21-25.

Rhajaoui, M., Nasereddin, A., Fellah, H., Azmi, K.,Amarir, F., Al-Jawabreh, A., Ereqat, S., Planer, J.and Abdeen, Z. New clinico-epidemiologic profile of cutaneous leishmaniasis, Morocco. *Emerging Infectious Disease.* 2007; 13: 1358–1360.

Rioux JA, Lanelotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzyme. Suggestion for a new classification. *Ann. Parasitol, Hum. Comp.* 1990, 65: 111-125.

Rodgers MR, Popper SJ, and Wirth DF: Amplification of Kinetoplast DNA As A Tool in the Detection and Diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology* 1990, 71: 267-275.

Rodriguez-Bonfante C, Bonfante-Garrido R, Grimaldi G Jr, Momen H, Cupolillo E. Genotypically distinct *Leishmania colombiensis* isolates from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans. *Infect Genetic and Evolution*. 2003: 119-24.

Romero GAS_a, Guerra MVF, Paes MG, Cupolillo E, Toaldo CB, Macedo VO, and Fernandes O: Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *Acta Tropica* 2001, 79: 225-229.

Romero GAS_b, Guerra MVD, Paes MG, and Macedo VD: Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: Therapeutic response to meglumine antimoniate. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2001, 65: 456.

Romero GA_b, Noronha EF, Pirmez C, Pires Fdo E, Fernandes O, Nehme NS, Cupolillo E, Firoozmand L, da Graça GC, Volpini A, Santos SL, Romanha AJ. Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for *Leishmania* detection using skin biopsy imprints on filter paper. *Acta Trop*. 2009 ;109(1):74-7.

Rotureau B, Ravel C, Couppié P, Pratlong F, Nacher M, Dedet JP, e Carme B. Use a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphisms analysis to identify the main New World properties and polymorphisms by application of the assay to clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44:459-467.

Rougeron V, De Meeûs T, Kako Ouraga S, Hide M, Bañuls AL. "Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)" in *Leishmania* after two decades of laboratory and field analyses. *PLoS Pathog*. 2010 19;6(8).

Ross R. Further notes on Leishman's. *British Medical Journal*. 1903; 11:1401.

Saf'janova VM 1982. The problem of taxonomy with *Leishmania*. *Ser Protozool Sov Acad Sci Leningr* 7: 5-109.

Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, and Jaffe CL PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2003; 47: 349-358.

Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology*. 2010;16:1-21.

Shahbazi F, Shahabi S, Kazemi B, Mohebbali M, Abadi AR, Zare Z. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. *Parasitol Res*. 2008 ;103(5):1159-62.

Sharma NL, Mahajan VK, Negi AK. Epidemiology of a new focus of localized cutaneous leishmaniasis in Himachal Pradesh. *J Commun Dis*. 2005; 37(4):275-9.

Shaw, 2006 J.J. Shaw, Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2006;101: 577–579.

Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiusa VOP and Brazil RP, Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2001;3: 285–291.

Silveira FT, Ishikawa EA, De Souza AA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite*. 2002; 9(1):43-50.

Simpson L. Structure and function of kinetoplast DNA. *J Protozool*. 1973; 20(1):2-8.

SINAN / Secretária de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde [<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>].19-06-2011

Singh S and Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. J Postgrad Med. 2003; 49(1):55-60.

Souza VL, Veras PS, Welby-Borges M, Silva TM, Leite BR, Ferraro RB, Meyer-Fernandes JR, Barral A, Costa JM, de Freitas LA. Immune and inflammatory responses to *Leishmania amazonensis* isolated from different clinical forms of human leishmaniasis in CBA mice. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011; 106(1):23-31.

Svobodova, M., Votycka, J., Peckova, J., Dvorak, V., Nasereddin, A., Baneth, G., Sztern, J., Kravchenko, V., Orr, A., Meir, D., Schnur, L. F., Volf, P. and Warburg, A. Distinct transmission cycles of *Leishmania tropica* in 2 adjacent foci, northern Israel. Emerging Infectious Diseases. 2006; 12:1860–1868.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol. 2007; 24(8):1596-9.

Tavares CA, Fernandes AP, Melo MN. Molecular diagnosis of leishmaniasis. Expert Rev Mol Diagn. 2003 ;3(5):657-67.

Tojal da Silva AC, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GA. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. Trop Med Int Health. 2006;11(9):1388-98.

van Eys, G. J., Schoone, G. J., Kroon, N. C., & Ebeling, S. B. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. Mol Biochem Parasitol. 1992; 51: 133–142.

Vega-López F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis. 2003 ;16(2):97-101.

Vera LA, Santos JB, Macêdo VO, de Magalhães AV, Ciuffo IA, Santos CG. Evaluation of secondary bacterial infection's influence on the course of cutaneous leishmaniasis in Corte de Pedra, Bahia. Rev Soc Bras Med Trop. 2001; 34(3):233-7.

Vergel C, Walker J and Saravia NG, Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction, Am. J. Trop. Med. Hyg.2005;72: 423–429.

Victoir, K., Banuls, A. L., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Hamers, R., Noel, S., De Doncker, S., Le Ray, D., Tibayrenc, M., & Dujardin, J. C. The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus. *Viannia* Parasitology.1998; 117: 1–13 .

Victoir K, De Doncker S, Cabrera L, Alvarez E, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, Le Ray D, and Dujardin JC: Direct identification of *Leishmania* species in biopsies from patients with American tegumentary leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2003, 97: 80-87.

Villinski, J. T., Klena, J. D., Abbassy, M., Hoel, D. F., Pupilampu, N., Mehta, S., Boakye, D. and Racznik, G. Evidence for a new species of *Leishmania* associated with a focal disease outbreak in Ghana. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2008; 60: 323–327.

Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, and Romanha AJ: PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. Acta Tropica 2004, 90: 31-37.

Volpini AC, Marques MJ, dos Santos SL, Machado-Coelho GL, Mayrink W, and Romanha AJ: *Leishmania* identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. Clinical Microbiology and Infection 2006, 12: 815-818.

Weigle KA, Saravia NG, Dedavalos M, Moreno LH, and Dalessandro A: *Leishmania braziliensis* from the Pacific Coast Region of Colombia - Foci of Transmission, Clinical Spectrum and Isoenzyme Phenotypes. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1986, 35: 722-731.

Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, and Barker DC. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. Journal of Clinical Microbiology 2002, 40: 601-606.

World Health Organization – WHO- (www.who.int/tdr/diseases)-07/01/2011.

WHO. Exp. Committee Control of Leishmaniasis. WHO Tech Rep.Ser 1990, 793: 1-158.

Wilson ME, Young BM, Andersen KP, Weinstock JV, Metwali A, Ali KM, and Donelson JE: A Recombinant *Leishmania chagasi* Antigen That Stimulates Cellular Immune-Responses in Infected Mice. Infection and Immunity 1995, 63: 2062-2069.

Zelazny AM, Fedorko DP, Li L, Neva FA, Fischer SH. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania spp.* Am J Trop Med Hyg. 2005 ;72(4):415-20.