



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PRISCILLA EMMANUELLE MACHADO

COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS PARASITOLÓGICO,
IMUNOLÓGICO E MOLECULAR NA DETECÇÃO DE *Leishmania*
spp. EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DE SANTA
CATARINA

FLORIANÓPOLIS

2004

PRISCILLA EMMANUELLE MACHADO

**COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS PARASITOLÓGICO,
IMUNOLÓGICO E MOLECULAR NA DETECÇÃO DE *Leishmania*
spp. EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DE SANTA
CATARINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de mestre em Biotecnologia-Área da Saúde, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina

Orientador: Dr. Mário Steindel

Co-Orientador: Dr. Edmundo Carlos Grisard

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

FLORIANÓPOLIS

2004

***Há homens que lutam um dia e são bons,
Há outros que lutam um ano e são melhores,
Há os que lutam muitos anos e são muito bons,
Mas há os que lutam toda a vida e estes são
imprescindíveis.***

(Bertold Brecht)

À MINHA MÃE, POR INFINITAS RAZÕES...AMO VOCÊ!

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Mário Steindel, com enorme carinho, pela confiança, por mais uma oportunidade e excelente orientação ao longo destes seis anos de laboratório.

Ao Dr. Edmundo Carlos Grisard pelos ensinamentos e paciência ao longo destes dois anos.

Ao Dr. Álvaro Romanha, do Instituto de Pesquisa René Rachou de Belo Horizonte, pela valiosa colaboração na conclusão deste trabalho. Muito Obrigada!

Ao Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário (HU), em especial ao Dr. Marcelo Rigatti, pela colaboração no atendimento aos pacientes.

Aos pacientes, sem os quais não haveria razão para realizar este trabalho. Meu respeito e agradecimentos.

À minha grande amiga Fabiana Pacheco Girardi, minha irmãzinha de coração, por tantas situações que passamos juntas, nestes dois anos tão difíceis, ao longo dos quais eu tive a certeza de que Deus envia anjos para nos auxiliar nestes desafios da vida...E você é um deles!

Ao amigo Leonardo Barbosa Koerich, pela amizade, pelas bebedeiras, pela convivência, pelas bebedeiras, pela força, pelas bebedeiras, pelas broncas que levamos juntos, pelas bebedeiras, por ser especial...Há, e pelas bebedeiras!

À amiga Aline Marie Fernandes, pela amiga querida que foi neste último ano, pela acolhida nas horas de desespero e pelos bons momentos que passamos juntas...Espero que não nos percamos de vista!

À Bibiana Paula Dambrós, minha "irmãzona mais velha" (CHATA!), pela grande força, pelos inúmeros puxões de orelha e sobretudo, pela sua valiosa amizade.

À amiga Cristiane Quimelli pelo agradável convívio e boas risadas sempre presentes no nosso dia-a-dia.

Ao amigo Koga pela amizade, grande apoio e incentivo sempre recebidos.

À amiga, de mais uma caminhada, Fabíola Cunha Bernardes e Rezende com enorme carinho!

À Graci e Rodrigo, pelos vários géis de agarose...Vocês são uns amores!

Aos colegas de Laboratórios (Proto e Virologia)...Lá vai: **LETÍCIA** (!), Juliana Berka, Glauber, Milene, Janaína, Daniele, Daniela, Rúbia, Débora, Roberto, João, Vivi, Mônica, Marcos (nosso novo pupilo!), Juliana, Jean, Luciane,

Márcia, Ravier, Alexandre (será que esqueci alguém?!), pela agradável convivência! Muita sorte e sucesso no caminho de vocês!

Aos “mestres” e amigos já distantes, Juliano Bordignon, Kleber Maciel Pieri, Jones (Ôpa! Fabiano!), Ingrid Thais Beltrame-Botelho pela amizade e apoio enquanto estiveram por perto.

Ao Dr. Carlos Roberto Zanetti pelas conversas valiosíssimas e pela pessoa maravilhosa que é!

Aos meus queridos avós, irmãos, cunhados e sobrinhos(!) pelo carinho apoio e torcida à distância! Amo todos vocês!

Finalmente, ao meu pai, Paulo Roberto Machado (*in memorian*) pelo orgulho que sentia das minhas conquistas, por ter me dado muito mais do que eu precisava pra chegar até aqui. Muitas saudades...

SUMÁRIO

	Lista de Tabelas	viii
	Lista de Figuras	ix-x
	Lista de abreviaturas	xi-xii
	Resumo	xiii
	Abstract	xiv
1	INTRODUÇÃO	1
2	JUSTIFICATIVA	11
3	OBJETIVOS	14
	3.1 Objetivo Geral	14
	3.2 Objetivos Específicos	14
4	MATERIAIS E MÉTODOS	15
	4.1 Pacientes	15
	4.2 Coleta das amostras	15
	4.3 Microscopia	16
	4.4 Intradermorreação de Montenegro (IDRM)	16
	4.5 Preservação das Amostras para a Extração de DNA	16
	4.6 Controles	17
	4.6.1 Controle Positivo	17
	4.6.2 Controle Negativo	17
	4.7 Extração de DNA de <i>Leishmania</i> e Biópsia de Pele	17
	4.7.1 Extração de DNA de Amostras Preservadas em Papel de Nitrocelulose	19
	4.8 Dosagem de DNA	19

		9
4.9	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	20
4.10	Purificação dos produtos de PCR	22
4.11	Seqüenciamento do DNA	22
4.12	Perfil de restrição de fragmentos de DNA amplificados (PCR-RFLP)	22
5	Resultados	24
6	Discussão	39
7	Conclusões	55
8	Referências Bibliográficas	56

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Matriz utilizada na formulação dos 12 diferentes tampões utilizados nas otimizações das reações de PCR (adaptado do kit Opti-Primer® - Stratagene).	21
Tabela 2: Características clínicas de 53 pacientes com suspeita e casos confirmados de leishmaniose.	25
Tabela 3: Comparação dos métodos parasitológicos, imunológicos e da PCR no diagnóstico leishmaniose.	34
Tabela 4: Resultados da PCR de acordo com a forma de preservação das amostras clínicas obtidas de 48 pacientes com suspeita de leishmaniose.	35
Tabela 5: Número de casos de infecção por <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i> por região de infecção	38

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Número de casos atendidos no Laboratório de Protozoologia da UFSC de 1993 a 2003.	24
Figura 2: Distribuição dos casos de Leishmaniose atendidos no Laboratório de Protozoologia – UFSC por região de origem	26
Figura 3: Eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação da região conservada do kDNA de <i>Leishmania amazonensis</i> utilizando o protocolo dos 12 tampões (canaletas 2-13). Canaleta 1= Controle negativo (sem adição de DNA), TM= Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido com <i>HaeIII</i>).	27
Figura 4: Eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado pelo brometo de etídio representando os produtos de amplificação via PCR do minicírculo de kDNA de <i>L. braziliensis</i> utilizando um gradiente de temperatura variando de 45,9°C a 65°C (canaletas 1-11). TM= Padrão de tamanho molecular (123 ladder), CN= Controle negativo.	28
Figura 5: Eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação via PCR do minicírculo de kDNA de <i>L. amazonensis</i> (canaleta 1), <i>L. braziliensis</i> (canaleta 2) e <i>L. chagasi</i> (canaleta 3). TM= Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido com <i>Hae III</i>), CN= Controle negativo (sem DNA molde)	29
Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata demonstrando a sensibilidade de amplificação (20 ng a 200 ag) via PCR da região conservada do minicírculo de kDNA de <i>Leishmania braziliensis</i> pelos iniciadores L-kDNA-1 e L-kDNA-2. TM= Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido pela <i>Hae III</i>), CN= Controle negativo, 1= 20 ng, 2= 2ng, 3= 200 pg, 4= 20 pg, 5= 2 pg, 6= 200 fg, 7= 20 fg, 8= 2 fg, 9= 200 ag.	30

Figura 7: Eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado pelo brometo de etídio demonstrando a detecção de DNA de *Leishmania amazonensis* (2 ng) na presença de diferentes concentrações de DNA humano (20 ng a 10 000 ng) via PCR pelos iniciadores L-kDNA-1 e L-kDNA-2. TM= Padrão de tamanho molecular (123 ladder), CN= Controle negativo.

31

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 2,5% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação via PCR do DNA de outras etiologias (teste de especificidade). TM= Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido com *Hae* III), CN= Controle Negativo, 1= La, 2= Lb, 3= Lc, 4= esporotricose, 5= carcinoma espinocelular, 6= carcinoma basocelular, 7= DNA humano.

32

Figura 9: Eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado pelo brometo de etídio demonstrando a detecção de DNA de *Leishmania* spp. em biópsias de pele. TM= Padrão de tamanho molecular, CN= Controle negativo, Canaleta 1= La (2ng), 2= Lb (2ng), 3= Lc (2ng), 4= DNA humano (1400ng), 5-15= Pacientes 1, 2, 3 e 4 (1/10, 1/100, 1/1000).

33

Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 2,5% demonstrando os produtos da amplificação de biópsias de pele preservadas em papel de nitrocelulose. TM= Padrão de tamanho molecular, CN= Controle negativo, 1= La, 2= Lb, 3= Lc, 4= Controle negativo (DNA humano), 5-8= pacientes

35

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão (Low Melting) a 2% demonstrando os produtos amplificados via PCR para purificação utilizando o Kit QIAquick Gel Extraction Kit® (Qiagen, Valencia). TM= Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido com *Hae* III), 1= La e 2= Lb.

36

Figura 12: Gel de poliacrilamida a 10% corado pela prata demonstrando o DNA de pacientes com LTA amplificado via PCR com os iniciadores 150 e 152 e submetidos a clivagem com as enzimas de restrição *Hae* III e *Ava* I. pb= pares de base, M= Tamanho molecular, La= *Leishmania amazonensis*, Lb= *Leishmania braziliensis*, 14= amostra paciente 1, 04= amostra paciente 2, CN= Controle negativo.

37

Lista de abreviaturas

ag - Atograma

AP-PCR ou RAPD - do inglês *Arbitrary primed polymerase chain reaction*
ou *Random amplified polymorphic DNA*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Deoxinucleotídeos trifosfatados

ELISA – do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

g – Gramas

HNR – Hospital Nereu Ramos

HU – Hospital Universitário

HIV – do inglês *Human Immunodeficiency Virus*

IDRM – Intradermorreação de Montenegro

kb - Kilobases

kDNA - Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto

La - *Leishmania amazonensis*

Lb - *Leishmania braziliensis*

Lc - *Leishmania chagasi*

LC – Leishmaniose cutânea

LCD – Leishmaniose cutâneo difusa

LCM – Leishmaniose cutâneo mucosa

LSSP-PCR – do inglês *Low stringency single specific primer - Polymerase Chain Reaction*

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose visceral

M – Molar

MIP – Departamento de Microbiologia e Parasitologia

mm - milímetros

µg – Micrograma

mL– Mililitro

µL – microlitro

mM – Milimolar

ng – Nanograma

OMS – Organização Mundial da Saúde

°C – Graus Celsius

pb – Pares de bases

PBS – do inglês *Phosphate Buffer Saline*

PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*

pH – Potencial hidrogeniônico ou concentração de íons H⁺

RFLP - Perfil de restrição de fragmentos de DNA amplificados

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

RNA – Ácido ribonucléico

SBF – Soro bovino fetal

LSU rRNA – Subunidade maior do RNA ribossomal

Taq – *Thermus aquaticus*

TBE – Tampão Tris-Borato/ EDTA

TE – Tampão Tris/ EDTA

TM – Tamanho molecular

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo verificar a eficácia da PCR no diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em pacientes do Estado de Santa Catarina comparando com a microscopia e intradermorreação. Duas formas de preservação das amostras e de extração de DNA foram testadas: imprinting em papel de nitrocelulose (NP) e imersão em etanol 70% (EB). A extração do imprinting em papel de nitrocelulose (NP) foi realizada por eluição e a imersão em etanol 70% (EB) pelo método do fenol-clorofórmio. As amostras foram analisadas por PCR, utilizando oligonucleotídeos direcionados a região conservada do minicírculo do DNA cinetoplástico (kDNA). A microscopia detectou a presença de *Leishmania* sp. 80% das 55 amostras analisadas enquanto a PCR detectou a presença de *Leishmania* sp. em 74,5% das 55 amostras e em 75,5% de 45 amostras de pacientes submetidos ao Teste de Montenegro. A extração de DNA pelo fenol-clorofórmio das amostras EB mostrou-se mais eficiente quando comparada com a extração por eluição das amostras NP. Além disso, a PCR-RFLP foi empregada para a identificação das espécies de *Leishmania* das amostras de pacientes. A maioria das amostras foi identificada como *L. (Viannia) braziliensis*. Este trabalho sugere o uso da PCR para a confirmação dos casos de ACL onde a microscopia ou intradermorreação sejam negativas e mostra a predominância de *L. (V.) braziliensis* como espécie causadora da LTA em SC.

Palavra-chave: Leishmaniose Tegumentar Americana - Minicírculo de kDNA - Microscopia -Intradermorreação - PCR-RFLP.

ABSTRACT

The present study, had the objective to verify the efficacy of the PCR in the American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) diagnosis in patients from Santa Catarina State, comparing with microscopy and intradermo-reaction. Two kinds of sample preservation were tested: imprint in nitrocelulose paper (NP) and immersion in 70% ethanol (EB). The DNA of imprinted in nitrocelulose paper (NP) was extracted by elution and the immersion in 70% (EB) ethanol extracted by phenol-cloroform. Samples were analysed by PCR, using primers directed to the conserved region of the kinetoplast DNA (kDNA) minicircle. The microscopy detected *Leishmania* sp. in 80% of 55 samples analysed while the PCR technique detected *Leishmania* sp. in 74.5% of 55 samples analysed by microscopy and in 75.5% of 45 patients submitted to Montenegro's test. DNA extraction by phenol-cloroform from samples in EB had a greater efficacy than samples in NP extracted by ellution. Moreover, PCR-RFLP was used to identify *Leishmania* species in samples. The majority of samples were identified as *L. (Viannia) braziliensis*. This study suggests that the use of PCR as a confirmatory tool for ACL diagnosis were microscopy or intradermo reaction showed to be negative. Also, it shows the predominancy of *L. (V.) braziliensis* as causative agent of ACL in Santa Catarina state.

Keywords: American Cutaneous Leishmaniasis, kDNA minicircle, intradermo-reaction, microscopy, PCR-RFLP.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Leishmania* (Ross, 1903), agrupa espécies de protozoários, heteroxenos, parasitos pertencentes à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. As Leishmanias apresentam-se na forma flagelada promastigota, encontrada no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e, amastigota, encontrada no interior de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro mamífero (DEDET et al., 1999, GRIMALDI-JR, 1982).

Inicialmente, a classificação taxonômica do parasita no Novo Mundo levava-se em consideração aspectos epidemiológicos, manifestações clínicas e a distribuição geográfica da doença. Posteriormente, aspectos biológicos, bioquímicos e moleculares também orientaram a classificação. Atualmente as leishmanias do Novo Mundo são agrupadas em dois subgêneros, de acordo com o local de adesão e multiplicação dos parasitos no tubo digestivo dos flebotomíneos. As espécies que se desenvolvem no intestino posterior pertencem ao subgênero *Viannia*, enquanto que as espécies que se desenvolvem na porção média e anterior do tubo digestivo pertencem ao subgênero *Leishmania* (LAINSON & SHAW, 1987; CASTILHO, SHAW & FLOETER-WINTER, 2003).

Pelo menos vinte espécies de *Leishmania* são conhecidas como causadoras de doença ao homem (SALMAN, RUBEIZ & KIBBI, 1999). Alexandre Cerqueira em 1885, na Bahia, foi o primeiro a identificar a moléstia e a suspeitar do papel dos flebotomíneos como vetores. Gaspar Vianna, em 1911, propôs a denominação de *Leishmania braziliensis* para o agente da LTA

no Brasil. Atualmente, seis espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, foram identificadas no Brasil como causadoras de LTA humana. Cinco espécies pertencem ao subgênero *Viannia*: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi* e *L. Shawi* e uma, *L. amazonensis*, subgênero *Leishmania* (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994, GONTIJO & CARVALHO, 2003).

O protozoário é transmitido através da picada da fêmea de insetos da Ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília Phlebotominae. Estes insetos apresentam hábitos noturnos e são facilmente encontrados nas regiões tropicais e subtropicais. No Velho Mundo, a doença é transmitida por insetos do gênero *Phlebotomus*, enquanto que nas Américas o gênero *Lutzomyia* e mais raramente, *Psychodopygus* sp., são responsáveis pela transmissão (KILLICK-KENDRICK, 1999; MEDEIROS & ROSELINO, 1999).

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, no Velho e Novo Mundo e que acometem o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos (GONTIJO & CARVALHO, 2003). A doença apresenta grande diversidade de manifestações clínicas, com diferenças marcantes na gravidade e impacto sobre a saúde, podendo ser responsável por lesões única ou múltiplas na pele, em mucosa nasal e orofaríngea que se manifestam desde o início da moléstia ou vários anos após o tratamento, podendo causar seqüelas graves ou mesmo irreversíveis nos pacientes acometidos (PASSOS, 1998). O acometimento de órgãos internos também pode ser observado na infecção por este parasita, ocasionando o quadro de leishmaniose visceral (PEARSON & SOUSA, 1996).

A leishmaniose é primariamente uma enzootia de animais silvestres. O homem representa um hospedeiro acidental e parece não ter um papel importante na manutenção do parasita na natureza (GONTIJO & CARVALHO, 2003). A transmissão ocorre quando este penetra em áreas onde a doença existe, passando a ter um caráter zoonótico do ponto de vista epidemiológico (RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2002,). Um grande número de espécies de mamíferos como roedores, edentados, marsupiais, procionídeos, canídeos, primatas e ungulados primitivos agem como reservatório de *Leishmania* spp. De maneira geral, em hospedeiros não humanos a infecção usualmente permanece benigna e inaparente, sugerindo uma antiga e bem balanceada relação parasito-hospedeiro (GENARO, 2000). Em hospedeiros acidentais, incluindo o homem e alguns animais domésticos, como cães, burros e cavalos, a doença se apresenta sob forma de lesões ulceradas na pele. Cães e eqüinos têm sido encontrados infectados com freqüência em diferentes regiões endêmicas (FALQUETO et al., 1986, AGUILLAR et al., 1989). Tanto os cães quanto os eqüinos apresentam doença semelhante àquela observada no homem e, inclusive, eqüinos respondem ao tratamento antimonial utilizado para tratamento dos casos humanos (MARZOCHI, SCHUBACH & MARZOCHI, 1999).

O curso da infecção pela leishmaniose é influenciado tanto por fatores ligados ao parasito, vetor, bem como ao hospedeiro. Ou seja, a habilidade da *Leishmania* sp. em causar diferentes formas clínicas depende da natureza do agente infectante (sua espécie, infectividade e virulência, disseminação hematogênica ou linfática), de fatores da saliva do inseto vetor e da resposta

imune e susceptibilidade genética do hospedeiro (DEDET, 1999, SALMAN, RUBEIZ & KIBBI, 1999).

As principais manifestações observadas nos pacientes com leishmaniose tegumentar americana (LTA) podem ser classificadas de acordo com seus aspectos clínicos, patológicos e imunológicos (PASSOS, 1998). A forma cutânea localizada (leishmaniose cutânea-LC), a forma mais comum da doença, é caracterizada por lesões ulcerosas, indolores, únicas ou múltiplas; a forma disseminada apresenta múltiplas úlceras cutâneas por disseminação hematogênica ou linfática, a forma cutaneomucosa (LCM) é caracterizada por lesões mucosas agressivas que afetam as regiões nasofaríngeas; e, finalmente, a forma difusa (LCD) com lesões nodulares não ulceradas (RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2002, SALMAN, RUBEIZ & KIBBI, 1999). A leishmaniose visceral americana (LV) causa febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, emagrecimento, edema e estado de debilidade progressivo levando à caquexia e, finalmente, ao óbito se o paciente não for submetido ao tratamento específico (GENARO, 2000, PEARSON & SOUSA, 1996).

Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), estima-se que a prevalência da doença seja de 12 milhões de casos com uma incidência anual de 400.000 a 600.000 novos casos de leishmaniose visceral e de 1 a 1,5 milhão de casos de leishmaniose cutânea. De acordo com a OMS estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas no mundo estão sob o risco de infecção pelo parasita, (KLAUS, FRANKENBURG & INGBER, 1999, <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisgeo1.html>, 2003, GONTIJO &

CARVALHO, 2003). Atualmente, a leishmaniose ocorre de forma endêmica em 88 países de quatro continentes. Apesar de sua importância na saúde pública, apenas 30 países fazem a notificação compulsória dos casos. Aproximadamente, 90% de todos os casos de leishmaniose visceral registrados são provenientes de 5 países: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal, e Sudão enquanto que, 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (DESJEUX, 1996). Considerando a leishmaniose cutânea cerca de 90% dos casos anuais são provenientes do Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (DESJEUX, 1996). A LTA ocorre nas Américas desde o Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina a exceção do Uruguai e do Chile. A incidência de LTA no Brasil tem aumentado, nos últimos 20 anos, em praticamente todos os Estados. Surtos epidêmicos têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Amazônica, relacionados ao processo predatório de colonização. Nos últimos anos no Brasil, o Ministério da Saúde registrou média anual de 35 mil novos casos de LTA no país.

O diagnóstico da LTA abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais, onde, freqüentemente a associação de alguns desses elementos é necessária para se chegar ao diagnóstico final (FURTADO, 1980, GONTIJO & CARVALHO, 2003). Os exames laboratoriais podem ser divididos em técnicas de detecção do parasito (pesquisa direta, isolamento em cultura, inoculação em animais, histopatologia e reação em cadeia da polimerase-PCR) e técnicas de imunodiagnósticos (detecção da resposta imune celular, detecção de anticorpos e detecção do antígeno em imunocomplexos) (SALMAN, RUBEIZ & KIBBI, 1999).

A pesquisa direta do parasita pode ser realizada em material obtido da lesão por escarificação, aspirado ou biópsia. A visualização em microscópio óptico da forma amastigota de *Leishmania* sp. é possível após coloração pelo método de Giemsa ou Leishman (GENARO, 2000).

O diagnóstico histopatológico depende da identificação do parasita ou alterações histológicas características (MEHREGAN & MEHREGAN, 1999; SAFAEI, MOTAZEDIAN & VASEI, 2002). O diagnóstico de certeza, dado pela identificação do parasita, geralmente apresenta taxas de sensibilidade, em torno de 60% para LC e 37,5% para LCM (MAGALHÃES, 1986).

O isolamento do parasita pode ser feito através da cultura em meios apropriados de fragmentos do tecido ou de aspirado dos bordos da lesão e de linfonodos infartados de áreas próximas a esta, ou inóculo em animais susceptíveis como o hamster (GENARO, 2000).

A sensibilidade do isolamento em cultura é variável, geralmente baixa, em torno de 20 a 40%. Esta baixa sensibilidade está relacionada a aspectos da técnica de isolamento, à escassez do parasito (principalmente *L. (V.) braziliensis*) nas lesões e à freqüente contaminação do meio com fungos e bactérias (RODRIGUEZ et al., 1994).

A detecção da imunidade celular através da reação intradérmica de Montenegro (IDRM) tem sido empregada como o mais valioso recurso no diagnóstico imunológico da LTA, dada sua grande sensibilidade e especificidade. O teste consiste na injeção de uma suspensão de antígeno preparado com promastigotas para a indução de resposta de hipersensibilidade tardia, onde a reação é lida após 48 a 72 horas (SALMAN, RUBEIZ & KIBBI, 1999).

Sua sensibilidade é maior após três meses de evolução da doença. A IDR pode ser positiva em infecção subclínicas, após o tratamento ou indeterminadamente (MARZOCHI et al., 1980).

Várias técnicas foram desenvolvidas para o diagnóstico sorológico da leishmaniose, estas incluem a imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o Western blot (GONÇALVES et al., 2002). Em relação à detecção de anticorpos, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é indicada no diagnóstico da LTA por *Leishmania* do subgênero *Viannia*, dados os resultados satisfatórios encontrados com esta técnica. A utilização de *L. (V.) braziliensis* como antígeno na RIFI é pouco freqüente dada a dificuldade do isolamento e cultivo desta espécie (PASSOS, 1998). Os testes imunoenzimáticos (ELISA) são bastante utilizados. Estes testes têm sensibilidade semelhante e menor especificidade que a RIFI (ANTHONY et al., 1980), sendo mais práticos e mais caros que a RIFI. Outras técnicas de detecção de anticorpos como a hemaglutinação direta, difusão em gel, Western blot (GONÇALVES et al., 2002) e radioimunoensaio, são mais utilizadas preferencialmente no diagnóstico da leishmaniose visceral (KAR, 1995). O *Trypanosoma cruzi* e os parasitas do gênero *Leishmania* compartilham determinantes antigênicos que causa significativa reação cruzada nos testes sorológicos, diminuindo a especificidade do diagnóstico laboratorial podendo ocorrer distorção de análises epidemiológicas, tanto com relação ao diagnóstico como em relação a cura da LTA (VEXENAT, SANTANA & TEIXEIRA, 1996, GONÇALVES, et al., 2002).

Vários métodos são empregados na identificação taxonômica dos parasitas, todos com vantagens e limitações próprias. As novas abordagens

para a identificação de parasitas são baseadas em critérios bioquímicos, imunológicos e moleculares (CUPOLILLO et al., 2003, 1995; CUPOLILLO, MOMEN & GRIMALDI-JR, 1998), em contraposição aos critérios baseados apenas nas características clínicas, epidemiológicas e biológicas.

Os métodos mais comumente utilizados são eletroforese de isoenzimas, anticorpos monoclonais ou análise da heterogeneidade do kDNA, onde o isolamento e o crescimento do parasita em cultura axênica é necessário (GRIMALDI & TESH, 1993).

Nos últimos anos avanços significativos têm sido obtidos nas técnicas de detecção e caracterização das espécies do parasito. A recente adoção de tecnologias de análise de DNA e/ou RNA na detecção e caracterização de parasitas tem apresentado resultados bastante promissores (GULL, 2001). As técnicas apresentam-se reprodutíveis, muito sensíveis e com alta especificidade, estando as seqüências alvo no DNA nuclear, cinetoplástico ou ribossomal conservadas durante distintas fases do ciclo desses protozoários (GRISARD, 1999).

A aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a rápida detecção e identificação específica dos parasitas, sem necessidade de isolamento em cultura. A PCR reproduz *in vitro* o fenômeno da duplicação *in vivo* da molécula de DNA. Esta técnica permite a geração exponencial de cópias de seqüências específicas a partir de um DNA molde de dupla fita. A síntese enzimática utiliza além de iniciadores específicos, deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs) e a *Taq* DNA polimerase, uma enzima termoestável (SAIKI et al., 1985; MULLIS & FALOONA, 1987).

A técnica de PCR apresenta variantes que permitem caracterizar molecularmente isolados de diferentes espécies de parasitas como ao utilizar-se iniciadores arbitrários (AP-PCR ou RAPD), a condições de baixa estrigência, utilizando-se apenas um iniciador específico (LSSP-PCR) ou ainda amplificação específica seguida da clonagem e seqüenciamento de diferentes genes (BELKUN, 1995; BARRETO et al., 1996; GRISARD, 1999).

Para o diagnóstico das leishmanioses, um dos principais alvos das técnicas moleculares desenvolvidas até o momento é o DNA do cinetoplasto ou kDNA (RODGERS, POPPER & WIRTH, 1990; BELLI et al., 1998; PIRMEZ et al., 1999; ROMERO et al., 2001; SAFAEI, MOTAZEDIAN & VASEI, 2002; BASTRENTA, et al., 2003). O kDNA é constituído por duas moléculas distintas: os minicírculos de cerca de 1,42 Kb e os maxicírculos de cerca de 36 Kb. Os minicírculos apresentam 4 regiões constantes (120pb) eqüidistantes e intercaladas por 4 regiões variáveis (RODGERS, POPPER & WIRTH, 1990; GRISARD, 1999).

Os minicírculos de kDNA são ótimos alvos para técnicas de replicação molecular, pois além de encontrados em grande número (cerca de 10 mil cópias/célula), contêm uma região com cerca de 120 a 200 pares de base (pb) com grande homologia de nucleotídeos entre as espécies de *Leishmania*, conhecidas como região conservada do minicírculo de kDNA. Utilizando-se iniciadores complementares às seqüências conservadas dos minicírculos, é possível a detecção pela PCR de apenas uma amastigota de *L. Viannia* sp. e até 1% do kDNA de 1 parasita do subgênero *L. Leishmania* sp. (RODGERS et al., 1990).

WIRTH & MCMAHON-PRAT (1982) demonstraram a ausência de reação cruzada entre o kDNA total de *L. braziliensis* e *L. mexicana*, o que permitiu o desenvolvimento de sondas moleculares de minicírculo. Minicírculos clonados inteiros ou seus fragmentos são usados como sondas moleculares com sucesso (BRENIÉRE et al., 1999; PASSOS et al., 1999; RAMÍREZ et al., 2003), permitindo a caracterização genérica (DEGRAVE et al., 1994) ou específica (ULIANA et al., 1994; FERNANDES et al., 1996) do parasito.

Outro gene que vem sendo utilizado como instrumento molecular na caracterização de diferentes espécies da Ordem Kinetoplastida é o gene do mini-exon (FERNANDES et al., 1993; 1994; GRISARD, et al., 2000).

Apresentando uma localização nuclear e aproximadamente 200 a 300 cópias por célula arranjadas em seqüência, o gene do mini-exon, ou spliced-leader, é constituído de três regiões distintas: exon, intron e região intergênica. O exon, altamente conservado mesmo entre diferentes espécies, apresenta uma seqüência de 39 nucleotídeos que é adicionada pós-transcricionalmente em todos os mRNA nucleares. O intron apresenta maior variabilidade tanto de tamanho como de seqüência, sendo relativamente conservado entre as espécies de um mesmo gênero, apresentando tamanhos e seqüências nucleotídicas distintas mesmo entre espécies muito próximas (GRISARD, 1999).

2. Justificativa

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) constitui um dos principais problemas de saúde pública em países em desenvolvimento, levando a OMS a incluir esta doença entre as seis mais importantes doenças de origem parasitária no mundo (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

Apesar de cada espécie de *Leishmania* apresentar áreas de endemicidade peculiares, nenhuma manifestação clínica é única de uma espécie em particular (SALMAN, RUBEIZ & KIBBI, 1999; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2002). A severidade das manifestações clínicas em pacientes imunocompetentes depende, principalmente, da espécie de *Leishmania* envolvida. Pacientes com leishmaniose, associada com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), têm revelado aspectos imunopatológicos incomuns. Muitos pacientes portadores da co-infecção *Leishmania*-HIV apresentam perfis clínicos atípicos com envolvimento cutâneo causados por parasitas viscerotrópicos e envolvimento visceral ocasionado por parasitas dermatrópicos (SILVA et al., 2002). A infecção por diferentes espécies de *Leishmania* requer tratamentos distintos e a administração de subdoses do antimoniato utilizado na terapêutica, promove a resistência de determinadas espécies do parasita às drogas disponíveis (DEDET & PRATLONG, 2003).

As tradicionais técnicas de diagnóstico para leishmaniose, como o exame ao microscópio do parasita, são rápidas, entretanto, pouco sensíveis e inespecíficas. Desta forma, técnicas da biologia molecular como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) tornam-se uma alternativa rápida, sensível e diferencial para estudos clínicos e epidemiológicos de leishmanioses

(RODGERS, POPPER & WIRTH, 1990; DEGRAVE et al., 1994; RODRÍGUEZ et al., 1994; HARRIS et al., 1998; PASSOS et al., 1999; MONROY-OSTRIA, HERNANDEZ-MONTES & BARKER, 2000; ROMERO et al., 2001; MEDEIROS, RODRIGUES & ROSELINO, 2002; MÜLLER et al., 2003).

Apesar do kDNA se mostrar um bom alvo na detecção da infecção por *Leishmania* sp., por estar presente em um grande número de cópias no genoma destes parasitas (DEGRAVE et al., 1994), este não permite a realização de um diagnóstico específico. Para complementar a técnica, a hibridização com sondas de DNA espécie-específicas vem sendo utilizada, aumentando a qualidade do teste diagnóstico (RODRÍGUEZ, et al., 1994; WEISS, 1995; RAMOS et al., 1996; PASSOS et al., 1999)

Em Santa Catarina, SÃO THIAGO & GUIDA (1990) procederam à investigação clínico-epidemiológica em 22 pacientes suspeitos de LTA nos municípios de Quilombo e Coronel Freitas, Oeste do Estado. Quatorze dos 22 pacientes suspeitos foram considerados casos confirmados, 11 dos quais autóctones da área, estabelecendo-se assim a existência de um foco da doença no Estado. Estudos clínico-epidemiológicos de casos de leishmaniose atendidos no laboratório de Protozoologia no período de 1993 a 1998 mostram a ocorrência de casos de leishmaniose cutânea e mucocutânea em Santa Catarina (LIMA FILHO & STEINDEL, 1988). Neste estudo foi identificado um novo foco de transmissão da doença no município de Piçarras na região nordeste do Estado. GRISARD et al. (2000), caracterizaram quatro amostras de *Leishmania* sp. isoladas de casos humanos autóctones nos municípios de Chapecó e Piçarras. Dois isolados foram caracterizados pela imunofluorescência com anticorpos monoclonais, PCR e hibridização com sondas específicas

como sendo *L. (L.) amazonensis* e os outros dois isolados como *L. (V.) braziliensis*. O Estado de Santa Catarina constitui-se em uma recente área endêmica para leishmaniose. A identificação e caracterização das espécies do Gênero *Leishmania* envolvidas poderão fornecer informações epidemiológicas relevantes. Sendo assim, este estudo teve como objetivo diagnosticar e identificar as espécies de *Leishmania*, provenientes de pacientes encaminhados ao laboratório de Protozoologia da UFSC, através de técnicas moleculares, comparando-a com as técnicas diagnósticas convencionais (microscopia e intradermorreação).

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

- Comparar a técnica de PCR no diagnóstico da leishmaniose com as metodologias convencionais (microscopia e intradermorreação).

3.2 – Objetivos específicos

- Amplificar seqüências do minicírculo de kDNA que possibilitem a detecção de *Leishmania* spp. em biópsias de pacientes preservadas em álcool e em papel de nitrocelulose.
- Identificar as espécies de *Leishmania* responsáveis pelos quadros da doença no Estado de Santa Catarina, através da técnica de PCR-RFLP.
- Purificar e seqüenciar os produtos da amplificação do minicírculo de kDNA das amostras positivas provenientes de casos humanos de leishmaniose.
- Comparar as seqüências obtidas com seqüências disponíveis no GenBank, buscando a identidade das espécies de *Leishmania* envolvidas nos casos de leishmaniose.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Pacientes

Cinquenta e três pacientes com suspeita de leishmaniose, encaminhados ao Laboratório de Protozoologia para diagnóstico, foram incluídos no presente trabalho, após assinatura do termo de compromisso pelos mesmos e aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Humana e Animal (Processo 001/98). Os dados pessoais, epidemiológicos e clínicos foram coletados em fichas apropriadas. Após diagnóstico confirmatório, todos os pacientes receberam tratamento com antimonialo de meglumina (Glucantime[®], Rhodia) e foram acompanhados, semestralmente, por um período de pelo menos 1 ano para avaliação do prognóstico da doença.

4.2 – Coleta das Amostras

Amostras de cepas padrões de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* cultivadas em meio LIT e inoculadas em hamsters foram coletadas para a padronização da técnica de extração de DNA e da PCR.

Os pacientes foram encaminhados ao serviço de Dermatologia do Hospital Universitário (HU) ou serviço de Infectologia do Hospital Nereu Ramos (HNR) onde foram realizadas 55 biópsias do bordo das lesões cutâneas ativas ou de mucosa, segundo procedimentos padrões.

4.3 – Microscopia

Para a pesquisa das formas amastigotas do parasita foi realizada aposição da biópsia sobre 3 lâminas de vidro, que após secagem ao ar foi fixada com metanol por 2 minutos, corada pelo corante de Giemsa e examinadas em microscópio óptico utilizando-se objetiva de 100X. Para cada lâmina foram analisados 500 campos microscópicos.

4.4 – Intradermoreação de Montenegro (IRM)

Para avaliação da resposta imune celular, 0,1 mL do antígeno de Montenegro foi injetado por via subcutânea na região ventral do antebraço, utilizando-se seringa de insulina. A leitura foi realizada 48 a 72 horas após a inoculação, sendo o teste considerado positivo quando a endureção apresentou-se \geq a 5mm.

4.5 – Preservação das Amostras para a Extração de DNA

Duas formas de preservação das amostras foram testadas no presente trabalho. O mesmo fragmento de biópsia utilizado para a microscopia direta foi lavado em tampão fosfato salina (PBS) estéril e utilizado para a realização de impressões sobre papel de nitrocelulose e, em seguida, preservado em etanol 70% para posteriormente proceder-se a extração de DNA.

4.6 – Controles

4.6.1 – Controle Positivo

Como controle positivo foram utilizadas cepas padrões de *L. amazonensis* (MHOM/BR/89/JSC89-H1; MHOM/BR/89/JSC89-H2), *L. braziliensis* (MHOM/BR/96/LSC96-H3; MHOM/BR/97/LSC97-H4; L2904) e *L. chagasi* (BH-46). Os parasitas foram cultivados em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) acrescido de 15% de soro bovino fetal (SBF) e mantidos a 27°C através de passagens semanais (CASTELLANI et al., 1967). Parasitas na fase exponencial de crescimento foram lavados 3 vezes em PBS e mantidos a -20°C até o seu uso.

4.6.2 – Controle Negativo

Para excluir a possibilidade de reações cruzadas foram utilizadas cinco amostras de fragmentos de pele de pacientes com lesões dérmicas distintas da LTA, como: cromomicose, paracoccidiodomicose, úlcera vascular, esporotricose, carcinoma espinocelular e carcinoma basocelular. Além disso, DNA humano extraído do creme leucocitário, também foi utilizado como controle nas reações de amplificação.

4.7 - Extração de DNA de *Leishmania* e Biópsia de Pele

Para a extração do DNA de *Leishmania* em cultura foi utilizado o método do fenol clorofórmio descrito por SAMBROOK et al. (2001). O sedimento de

parasitas foi ressuspenso em tampão de extração (10mM de Tris pH 7,4, 10mM NaCl, 25 mM EDTA e 1% SDS) acrescido com Proteinase K (50 µg/mL) e então incubado por, no mínimo, uma hora e meia a 42° C. Para a desproteinização foi adicionado fenol neutralizado (v/v) misturando-se os tubos gentilmente por inversão por cerca de 10 minutos e, em seguida, centrifugando-se a 14.000 x g pelo mesmo tempo. Após a centrifugação, observou-se a formação de duas fases distintas: uma fase superior, aquosa, que foi removida para novo tubo onde foi adicionado volume igual de fenol clorofórmio, misturando-se gentilmente por mais 10 minutos para então, proceder nova centrifugação a 14.000 x g por tempo equivalente ao da mistura. Em seguida, a fase aquosa foi novamente transferida para tubo esterilizado, onde igual volume de clorofórmio foi acrescido, misturando-se por 10 minutos e centrifugando a 14.000 x g por mais 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o DNA precipitado adicionando-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol 100% gelado e centrifugado por 30 minutos a 14.000 x g. O sedimento foi lavado duas vezes em etanol 70% gelado e eluído em 50µL de 50mM Tris-10mM EDTA (TE) ou água bidestilada e desmineralizada estéril e estocado a -20°C.

Para a extração de DNA das biópsias, seguiu-se o mesmo protocolo descrito acima, com exceção dos procedimentos anteriores à lise da amostra. Os fragmentos de pele preservados em etanol 70% foram lavados duas vezes em PBS estéril e depois fragmentados com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sobre lâmina de vidro, colocados em tubos estéreis e macerados, utilizando-se pistilos de plástico. Em seguida, foram adicionados 500 µL do tampão de extração acrescido de Proteinase K (100 µg/mL). O material foi incubado a

42°C por, no mínimo, 12 horas e após este período, seguiu-se o protocolo de extração descrito anteriormente.

4.7.1 – Extração de DNA de Amostras Preservadas em Papel de Nitrocelulose

Para a extração de DNA de amostras preservadas em papel de nitrocelulose, utilizou-se o protocolo descrito por MACHADO et al (2000) onde, 10 mm² de papel foi cortado com o auxílio de uma lâmina de bisturi, adicionado 50 µL de água Milli-Q e fervido por 20 minutos. Após centrifugação a 14 000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi utilizado diretamente como molde para a pesquisa de *Leishmania* spp. pela reação de PCR.

4.8 – Dosagem do DNA:

As amostras de DNA obtidas da cultura de *Leishmania* foram dosadas utilizando-se um espectrofotômetro (BioPhotometer[®], Eppendorf, Hamburg), observando o grau de pureza das amostras determinado pela relação da absorbância a 260/280 nm. Para avaliação da integridade e dosagem do DNA as amostras foram comparadas com padrões conhecidos em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio e visualizadas em transluminador MacroVue UV20[®] (Hoefer, San Francisco) e fotografadas.

As amostras de DNA obtidas de biópsia e de papel de nitrocelulose não foram dosadas.

4.9- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a detecção do parasita via PCR, um par de iniciadores foi desenhado, com base em oligonucleotídeos previamente descritos na literatura (MEDEIROS, RODRIGUES & ROSELINO, 2002; ROMERO et al., 2001), utilizando-se o programa Blastn, alinhando seqüências do minicírculo de kDNA de diferentes espécies de *Leishmania* contidas no Genbank (Acesso no Genbank: U19807; M94088 e Z35276). Os iniciadores obtidos, flanqueadores da região conservada do minicírculo de kDNA de *Leishmania* sp., foram sintetizados pela empresa Invitrogen (São Paulo – Brasil) e apresentam as seguintes seqüências: L-kDNA-1 (5' GGG (G/T)A GGG GCG TTC TGC GAA-3') e L-kDNA-2: (5'-AT(T/A) TTA CAC CAA CCC C(A/G) A(C/T) TT-3').

A padronização da reação de PCR incluiu, inicialmente, a seleção do tampão, utilizando-se 12 diferentes tampões, os quais diferem nas concentrações de KCl, MgCl₂ e no pH (Tabela 1). Ensaios utilizando gradientes de temperatura variando de 45°C a 65°C foram utilizados para escolha da temperatura ótima de ligação dos iniciadores à fita molde de DNA.

Para a verificação da sensibilidade dos iniciadores foram testadas as ampliações de diferentes concentrações de DNA de *Leishmania*, que variaram de 20 ng a 200 ag. A especificidade foi comprovada utilizando-se DNA de lesões de etiologias distintas da leishmaniose citadas no item 4.6.2.

Para detecção de DNA de *Leishmania* nas amostras provenientes de pacientes utilizou-se 2 µL de DNA molde nas diluições (1:10, 1:100 e 1:1000) na presença do tampão de reação (3,5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,8) contendo 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Cenbiot, Porto Alegre), 2

mM de deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 10 pmoles dos iniciadores num volume final de 10 μ L/reacção. As amplificações foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient[®] (Eppendorf, Hamburg).

Cada conjunto de reacção foi acompanhado de um controle negativo, que continha todos os reagentes necessários a amplificação, com exceção do DNA molde, de um controle contendo apenas DNA humano e de três controles positivos, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*. As condições de reacção adotadas para a amplificação das amostras utilizando os iniciadores L-kDNA-1 e L-kDNA-2 foram as seguintes: 94°C por 4 minutos, seguidos por 30 ciclos com temperatura de desnaturação a 94°C por 1 minuto, ligação a 57°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Tabela 1: Matriz utilizada na formulação dos 12 diferentes tampões utilizados nas otimizações das reacções de PCR.

10mM Tris-HCL	MgCl₂	25 mM KCl	75mM KCl
pH 8,3	1,5 mM	Tampão 1	Tampão 2
pH 8,3	3,5 mM	Tampão 3	Tampão 4
pH 8,8	1,5 mM	Tampão 5	Tampão 6
pH 8,8	3,5 mM	Tampão 7	Tampão 8
pH 9,2	1,5 mM	Tampão 9	Tampão 10
pH 9,2	3,5 mM	Tampão 11	Tampão 12

Todos os procedimentos de pré e pós-amplificação foram realizados em ambientes diferentes, não compartilhando materiais, reagentes e/ou equipamentos. Após a PCR, o material amplificado foi submetido à eletroforese, conforme descrito no item 4.8.

4.9 – Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR obtidos com os iniciadores L-kDNA-1 e L-kDNA-2 foram resolvidos em gel de agarose de baixo ponto de fusão (Nusieve®, Rockland) a 2%, excisados e purificados utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction Kit® (Qiagen, Valencia), conforme instruções do fabricante.

4.10 - Seqüenciamento do DNA

O seqüenciamento dos fragmentos purificados foi realizado em um equipamento MegaBace 1000® DNA Analysis System, utilizando o Kit DyeEnamic® ET dye terminator (Amershan Biosciences), conforme especificações do fabricante. Para a reação de seqüenciamento utilizou-se o iniciador L-kDNA-1.

4.11 – Perfil de restrição de fragmentos de DNA amplificados (PCR-RFLP).

Quarenta amostras de DNA de pacientes foram submetidas ao ensaio da PCR-RFLP para a identificação das espécies de *Leishmania* utilizando-se os iniciadores 150 – 5' GGG (G/T)AG GGG CGT TCT (C/G)CG AA 3' e 152: 5' (C/G)(C/G)(C/G) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C 3' complementares a região conservada do kDNA. A reação de amplificação dos fragmentos foi realizada em termociclador MJ Research PTC-100 conforme protocolo descrito por VOLPINI et al., 2004. Cada reação continha 200 µM de dNTP, incluindo dUTP ao invés de dTTP, 0,8 unidades de *Taq* polimerase (Invitrogen, São

Paulo), tampão de reação (10 mM Tris-HCl pH 8,6, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) e 1 µL de DNA molde, em um volume final de 10 µL. A amplificação consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 29 ciclos a 95°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos, 72°C por 10 segundos e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos.

Três microlitros dos produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% (Mini-Protean - BioRad, Hercules, CA) e corado pela prata para visualização das bandas.

Cinco microlitros dos produtos da amplificação foram utilizados para digestão, adicionando-se 1 U de *Hae* III (Invitrogen) por 3 horas a 37°C, em tampão apropriado para a enzima. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida a 10% e corados pela prata.

Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou, em Belo Horizonte, Minas Gerais.

5. RESULTADOS

O Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina vem realizando o diagnóstico da leishmaniose desde 1993. A partir de 2001, passou a ser o laboratório de referência para o diagnóstico da doença em Santa Catarina. A figura 1 mostra o número de diagnósticos realizados no período de 1993 a 2003.

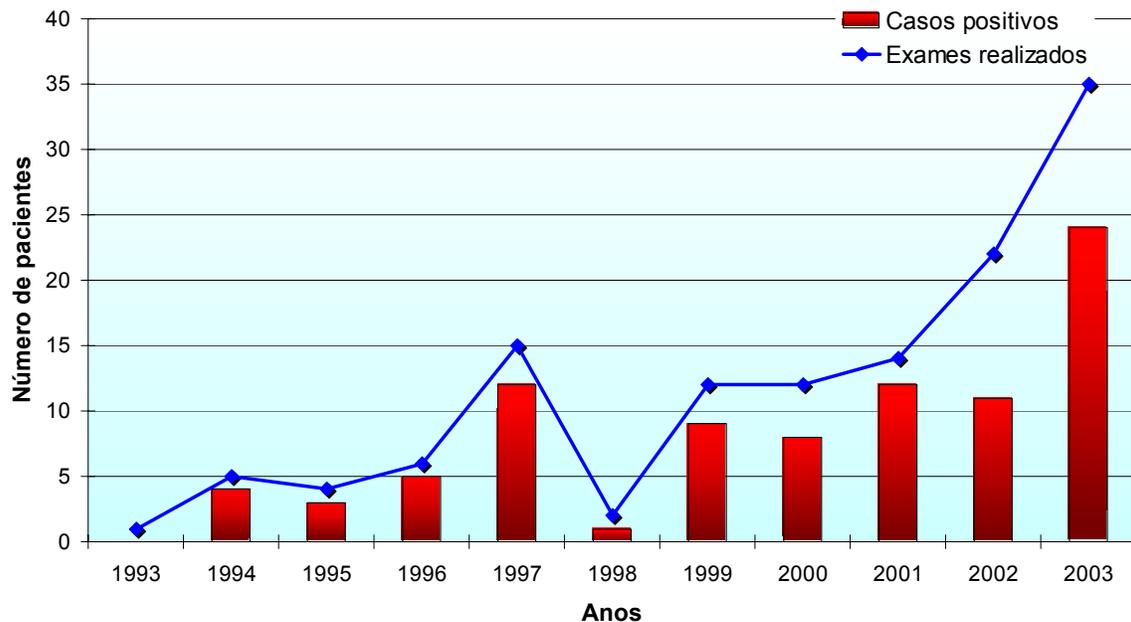


Figura 1: Número de pacientes e casos de leishmaniose tegumentar americana diagnosticados no Laboratório de Protozoologia da UFSC de 1993 a 2003.

Foram incluídos neste estudo 53 pacientes com suspeita clínica de leishmaniose, os quais foram analisados com relação às características, epidemiológicas, clínicas e laboratoriais. Destes, 43 (81,13%) eram do sexo masculino e 10 (18,86%) do sexo feminino, com idade variando de 2 a 79 anos

(Tabela 2). Quase a totalidade dos pacientes residia em municípios do Estado de Santa Catarina, sendo apenas um paciente procedente de outro Estado (Roraima) (Tabela 2).

A forma clínica mais comumente observada foi a cutânea com uma média de 1,9 lesões por paciente (variação de 1 a 15 lesões) e com tempo médio de evolução de 7,6 meses (Tabela 2).

Tabela 2: Características clínicas de 53 pacientes com suspeita e casos confirmados de leishmaniose

CARACTERÍSTICA	VALOR	Mínimo-Máximo
Média de Idade (anos)	40,6	2-79
Sexo		
Masculino	81,13%	
Feminino	18,87%	
Forma Clínica		
Cutânea	50	
Mucocutânea	6	
Número de lesões/paciente	1,9	1-15
Tempo médio de evolução (meses)	7,6	0,5-48

Com relação a origem geográfica dos casos, a maioria dos casos eram importados dos Estados do Mato Grosso (28 casos), Pará (4 casos), Rondônia (3 casos), Paraná (1 caso), Rio de Janeiro (1 caso), Bahia (1 caso) e um de procedência desconhecida. Dez casos autóctones do Estado de Santa Catarina, foram procedentes do município de Piçarra (9 casos) e um caso do município de Penha (Figura 2).

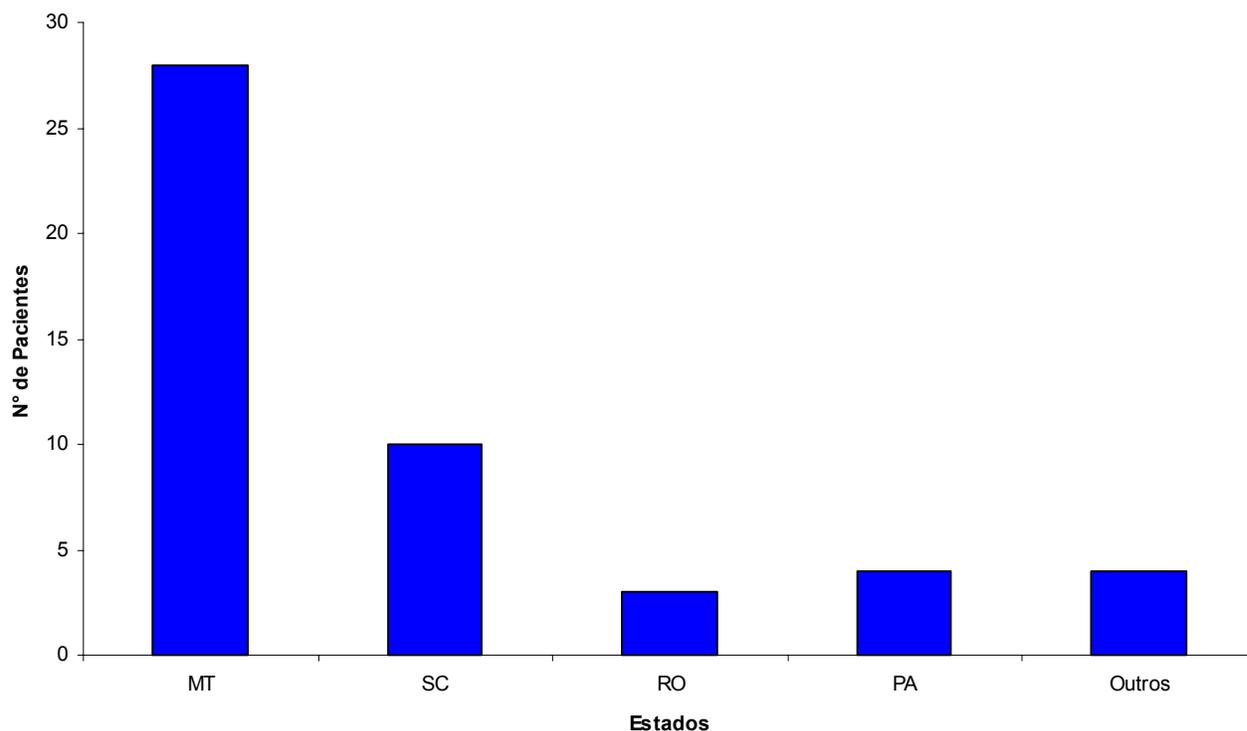


Figura 2: Distribuição dos casos de leishmaniose atendidos no laboratório de Protozoologia – UFSC, por Estado de origem.

A padronização da técnica da PCR visando a amplificação da região conservada do kDNA para a detecção de *Leishmania*, para amostras clínicas, foi realizada utilizando os iniciadores L-kDNA-1 e L-kDNA-2, inicialmente propostos por MEDEIROS et al. (2002) e ROMERO et al. (2001) para a amplificação da mesma região, mas com algumas modificações. Inicialmente, as condições de reação utilizadas foram as mesmas propostas pelos autores citados anteriormente.

Utilizando o protocolo dos 12 tampões (item 4.9) foi observada a amplificação de bandas de aproximadamente 120 pb em todos os tampões e,

nos tampões 3, 4, 7, 8, 11 e 12, uma banda adicional de 650 pb quando utilizado DNA de *Leishmania amazonensis* como molde (Figura 3).

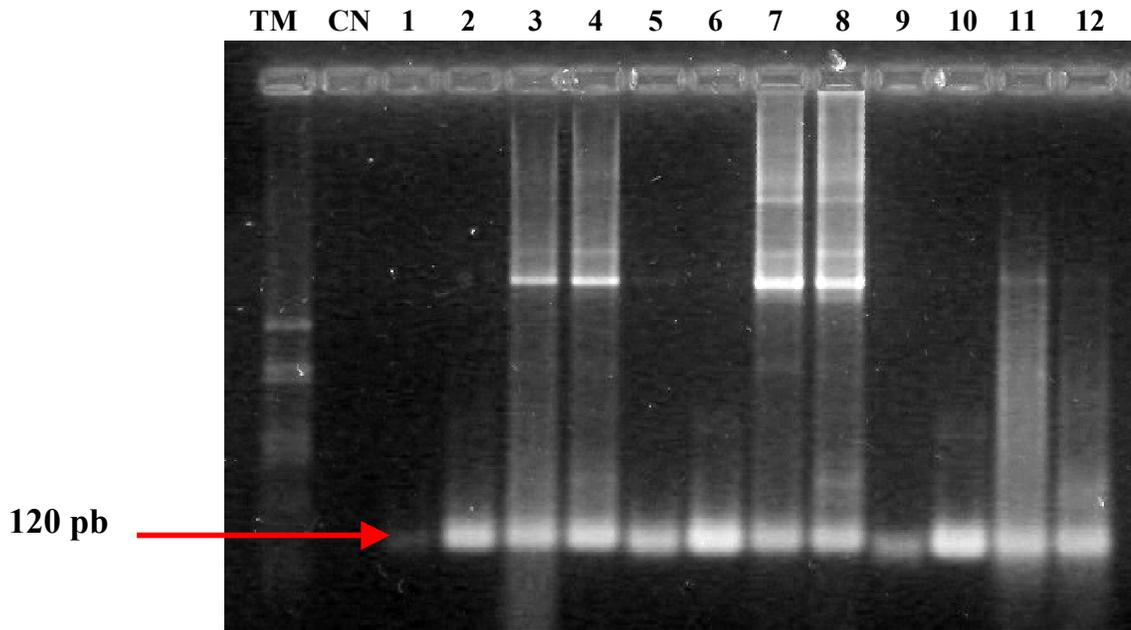


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação da região conservada do kDNA de *Leishmania amazonensis* utilizando o protocolo dos 12 tampões (canaletas 1 a 12). CN= Controle negativo (sem adição de DNA), TM= Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido com *Hae* III).

Devido a presença tanto do fragmento de 120 pb como a de 650 pb, o tampão 7 foi escolhido para as amplificações posteriores, objetivando verificar a origem do fragmento maior (Tabela 1).

Objetivando averiguar se a banda de 650 pb observada na Figura 2 era decorrente de ligações inespecíficas dos iniciadores ao DNA molde das diferentes espécies de *Leishmania*, foi realizada uma PCR utilizando um gradiente de temperatura, onde a temperatura de ligação dos iniciadores variou de 45,9°C a 65°C, em incrementos de $\pm 1^\circ\text{C}$. Com o aumento da temperatura

de ligação, observou-se a amplificação preferencial da banda de aproximadamente 700 pb em relação a banda de 120 pb correspondente a região conservada do minicírculo de kDNA (Figura 4).

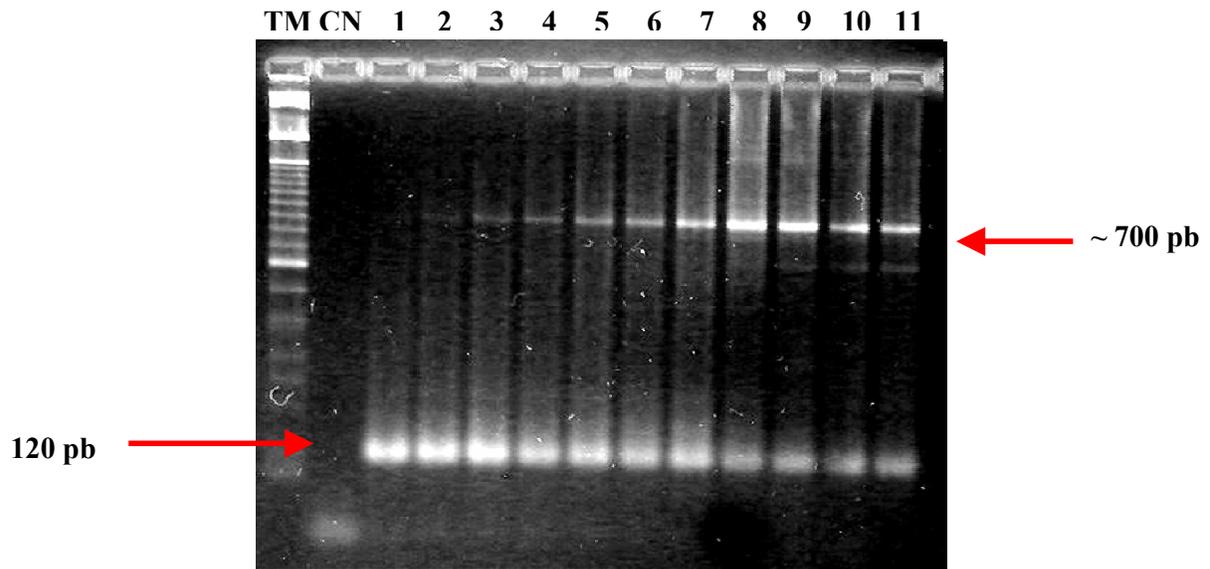


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado pelo brometo de etídio representando os produtos de amplificação via PCR do minicírculo de kDNA de *Leishmania braziliensis* utilizando um gradiente de temperatura variando de 45,9°C a 65°C (canaletas 1-11). TM= Padrão de tamanho molecular (123 ladder), CN= Controle negativo.

Utilizando-se as mesmas condições de reação descritas acima frente ao DNA de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*, verificou-se a geração de bandas de aproximadamente 650 pb, 700 pb e 800 pb, respectivamente, além do produto de 120 pb (Figura 5).

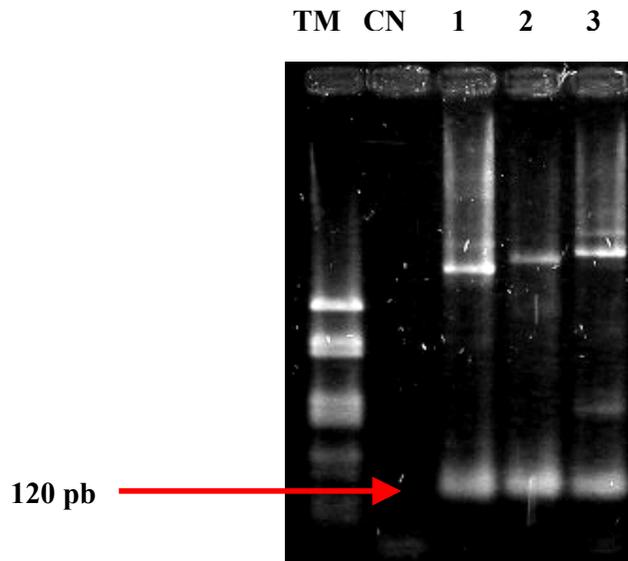


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação via PCR do minicírculo de kDNA de *Leishmania amazonensis* (canaleta 1), *Leishmania braziliensis* (canaleta 2) e *Leishmania chagasi* (canaleta 3). TM= Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido com *Hae* III), CN= Controle negativo (sem DNA molde).

Com base nestes resultados e interessados em verificar a origem dos produtos com tamanho superior a 120 pb adotou-se a temperatura de 57°C como temperatura padrão de ligação dos iniciadores para as reações seguintes.

Na seqüência, uma série de diluições, na ordem de 10 vezes, partindo de uma concentração de 10 ng/μL de DNA de *Leishmania* em cultura foi realizada para testar a sensibilidade dos iniciadores L-kDNA-1 e L-kDNA-2. A detecção limite de DNA de *Leishmania* sp. pelos iniciadores foi observada a uma concentração de 2 fg (Figura 6). Os mesmos resultados foram obtidos quando se utilizou DNA de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* como molde.

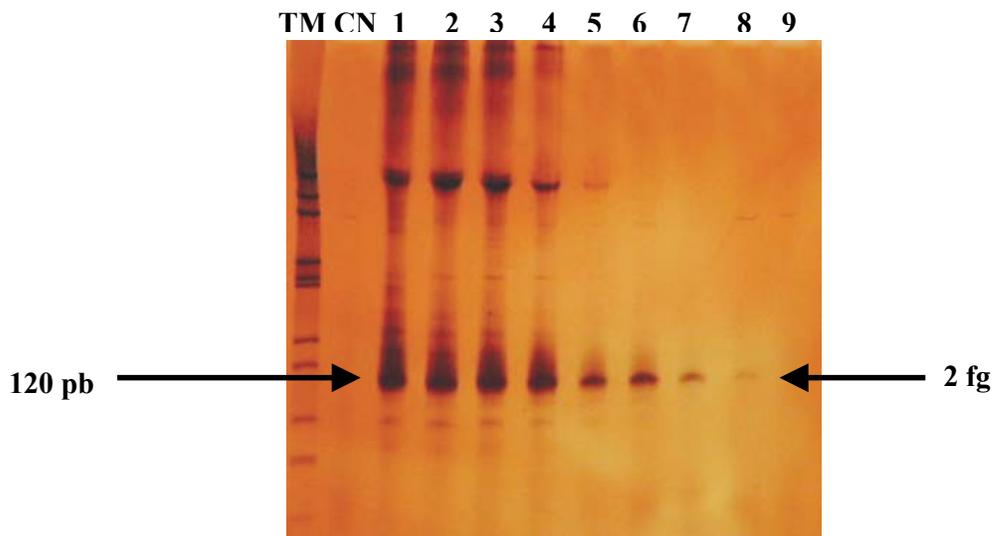


Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata demonstrando a sensibilidade de amplificação (20 ng a 200 ag) via PCR da região conservada do minicírculo de kDNA de *Leishmania braziliensis* pelos iniciadores L-kDNA-1 e L-kDNA-2. TM= Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido pela *Hae* III), CN= Controle negativo, 1= 20 ng, 2= 2ng, 3= 200 pg, 4= 20 pg, 5= 2 pg, 6= 200 fg, 7= 20 fg, 8= 2 fg, 9= 200 ag.

Como nas amostras de DNA extraído de biópsias de pele encontra-se uma concentração superior de DNA humano, um teste de reconstituição no intuito de verificar a sensibilidade dos iniciadores frente a esta variável foi realizado. O teste de reconstituição consistiu na adição de DNA humano, extraído do creme leucocitário, em concentrações que variaram de 10 vezes a 5 mil vezes frente a uma concentração constante de 2 ng do DNA de *Leishmania* sp. Foi verificada a amplificação do produto de 120 pb mesmo na presença de 8 μ g de DNA humano (Figura 7).

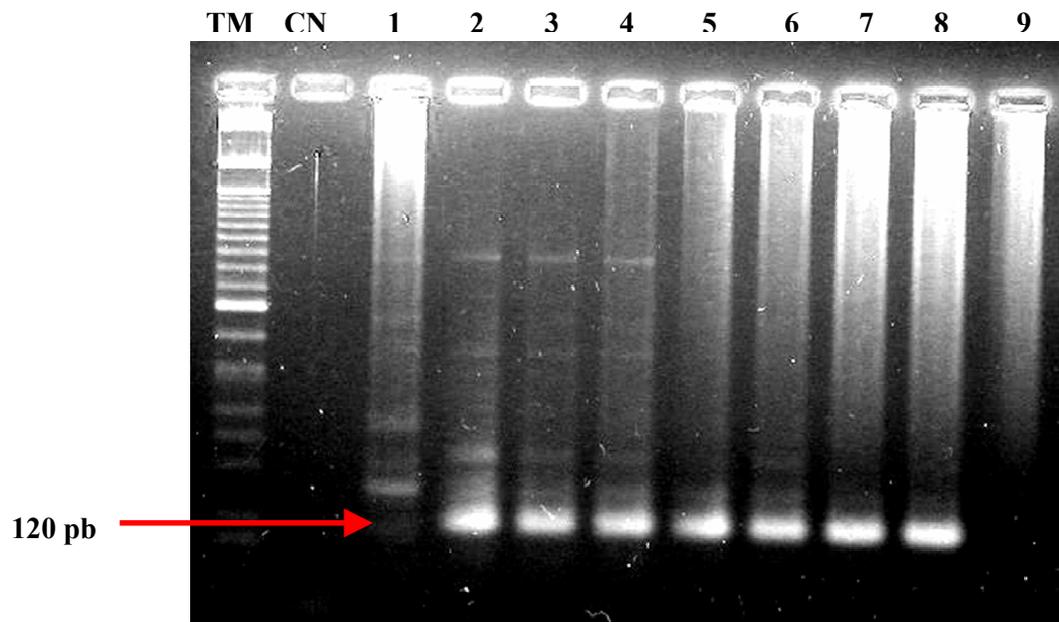


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado pelo brometo de etídio demonstrando a detecção de DNA de *Leishmania amazonensis* (2 ng) na presença de diferentes concentrações de DNA humano (20 ng a 10 000 ng) via PCR pelos iniciadores L-kDNA-1 e L-kDNA-2. TM= Padrão de tamanho molecular (123 ladder), CN= Controle negativo, 1= DNA humano (1400 ng), 2=La (2 ng), 3= La (2 ng) + (20 ng) DNA humano, 4= La (2 ng) + (200 ng) DNA humano, 5= La (2 ng) + (2000 ng DNA humano), 6= La (2 ng) + (4000 ng DNA humano), 7= La (2 ng) + (6000 ng) DNA humano, 8= La (2 ng) + (8000 ng) DNA humano, 9= La (2 ng) + (10000 ng) DNA humano.

A especificidade dos iniciadores L-kDNA-1 e L-kDNA-2 foi avaliada utilizando-se DNA extraído de lesões de outras etiologias (item 4.6.2) como molde na reação de amplificação. Os resultados obtidos mostraram a geração de bandas espúrias quando usado como molde DNA humano, carcinoma espinocelular, carcinoma basocelular e esporotricose (Figura 8). A especificidade dos iniciadores também foi testada utilizando-se DNA de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*, não havendo geração de produtos (resultado não demonstrado).

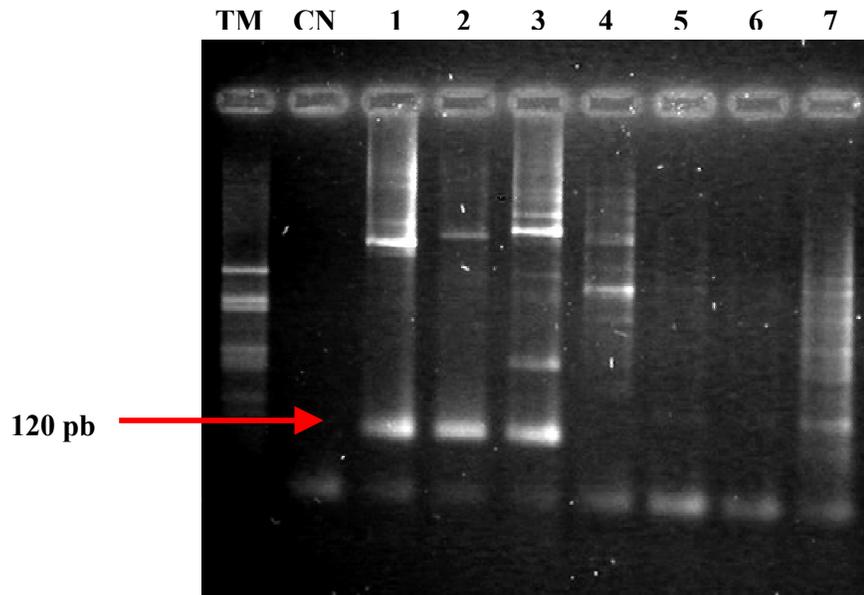


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 2,5% corado pelo brometo de etídio demonstrando os produtos de amplificação via PCR do DNA de outras etiologias (teste de especificidade). TM= Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido com *Hae* III), CN= Controle Negativo, 1= La, 2= Lb, 3= Lc, 4= esporotricose, 5= carcinoma espinocelular, 6= carcinoma basocelular, 7= DNA humano.

Estabelecidas todas as condições de reação da PCR, partiu-se para a detecção do DNA de *Leishmania* em biópsias de pele, obtidas de lesões cutâneas e de mucosa, dos pacientes diagnosticados no Laboratório de Protozoologia da UFSC. Os resultados do diagnóstico estão representados na Figura 9.

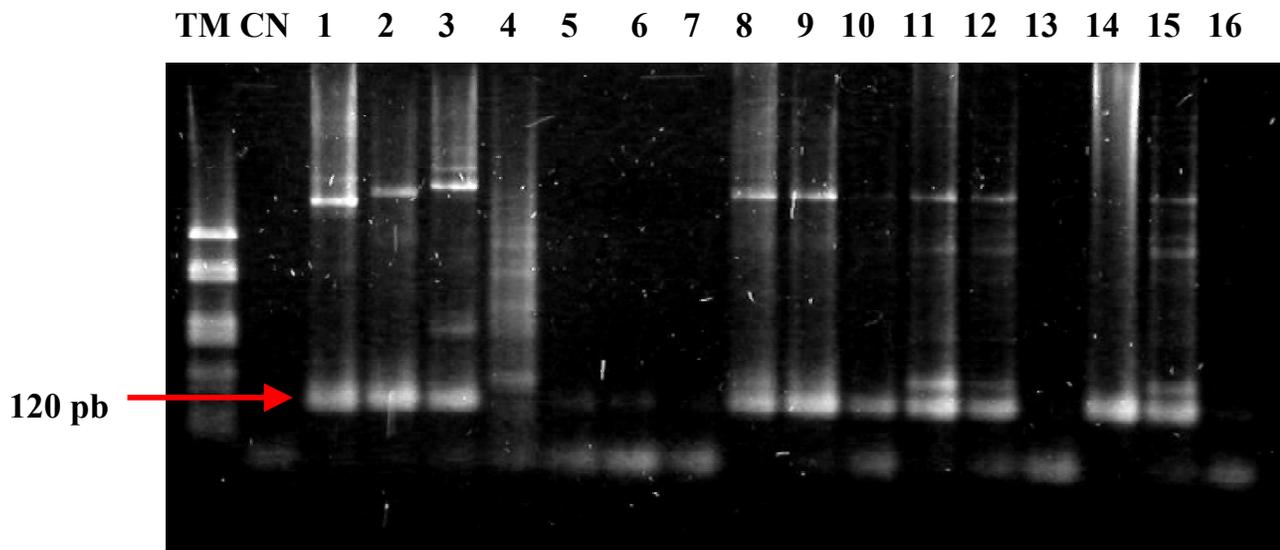


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado pelo brometo de etídio demonstrando a detecção de DNA de *Leishmania* spp. em biópsias de pele. TM= Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido com *Hae* III, CN= Controle negativo, Canaleta 1= La (2ng), 2= Lb (2ng), 3= Lc (2ng), 4= DNA humano (1400ng), 5-7= Paciente 1 (1/10, 1/100, 1/1000), 8-10= Paciente 2 (1/10, 1/100, 1/1000), 11-13= Paciente 3 (1/10, 1/100, 1/1000), 14-16= Paciente 4 (1/10, 1/100, 1/1000).

A eficácia da PCR na detecção do DNA de *Leishmania* spp. foi comparada com a das técnicas convencionais: microscopia e intradermorreação de Montenegro. A microscopia detectou a presença de *Leishmania* sp. em 80% das 55 amostras examinadas enquanto que a técnica da PCR detectou a presença de *Leishmania* em 74,54% das 55 amostras e a Intradermorreação de Montenegro foi positiva em 84% dos 45 pacientes submetidos ao teste.

De um total de 44 amostras positivas para a microscopia, 38 tiveram PCR positiva, enquanto que em 6 não houve confirmação do resultado pela técnica molecular. No entanto, das 11 amostras onde não foi possível a verificação de amastigotas pelo teste parasitológico, em 3 delas foi observada

a amplificação da banda de 120 pb correspondente ao produto de amplificação da região conservada do kDNA de *Leishmania* spp (Tabela 3).

De 39 pacientes que responderam a intradermorreação de Montenegro, 34 foram positivos pela PCR e 5 foram negativos. Todos os pacientes com IDRМ negativa foram negativos na PCR.

Tabela 3: Comparação dos métodos parasitológicos, imunológicos e da PCR no diagnóstico da leishmaniose

		PCR	
		Positivo	Negativo
Parasitológico Microscopia (n=55)	Positivo	44	6
	Negativo	38	8
Imunológico IRM (n=45)	Positivo	39	5
	Negativo	6	0

Comparando-se as formas de preservação das amostras e as metodologias de extração de DNA citadas em Materiais e Métodos (ítems 4.5, 4.7 e 4.7.1), a extração de DNA pelo fenol-clorofórmio das amostras preservadas em etanol 70% mostrou maior porcentagem de positividade (70,83%) em relação a extração por eluição das mesmas amostras preservadas em papel de nitrocelulose (60,41%). Este resultado foi

estatisticamente significativo quando realizado o teste do Qui-quadrado com $P < 0,05$ (Tabela 4 e Figura 10).

Tabela 4: Comparação da taxa de positividade da PCR de acordo com a forma de preservação das amostras clínicas obtidas de 48 pacientes com suspeita de leishmaniose.

Amostra Clínica Forma de Preservação	PCR		Positividade (%)
	Pos.	Neg.	
Biópsia (Etanol 70%)	34	14	70,83%
Papel de Nitrocelulose	29	19	60,41%*

* Resultado estatisticamente significativo ($P < 0,05$)

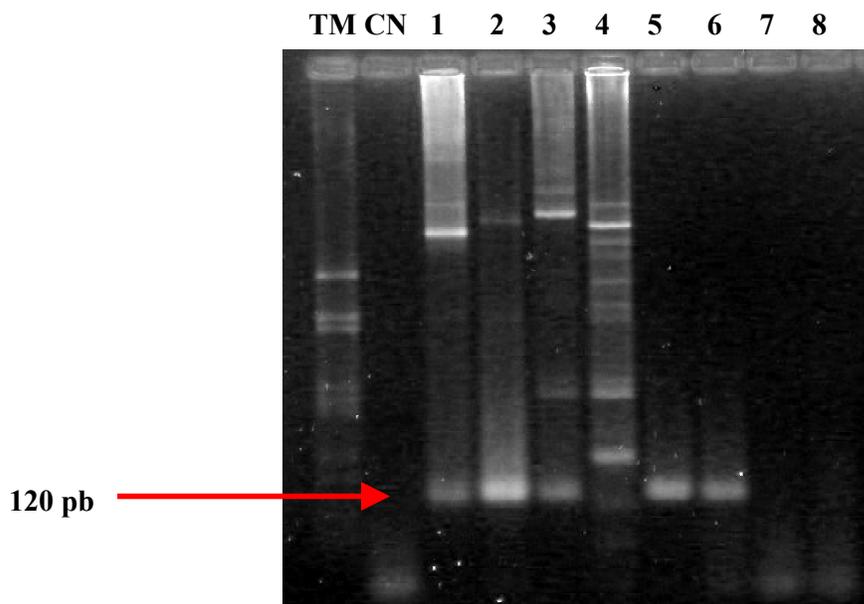


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 2,5% demonstrando os produtos da amplificação de biópsias de pele preservadas em papel de nitrocelulose. TM=Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido com *Hae* III, CN= Controle negativo, 1= La, 2= Lb, 3= Lc, 4= Controle negativo (DNA humano), 5-8= pacientes

A purificação dos produtos de PCR utilizando o Kit QIAquick Gel Extraction Kit[®] mostrou-se pouco eficiente, sendo a concentração de DNA recuperada insuficiente para a realização da reação de seqüenciamento (Figura 11).

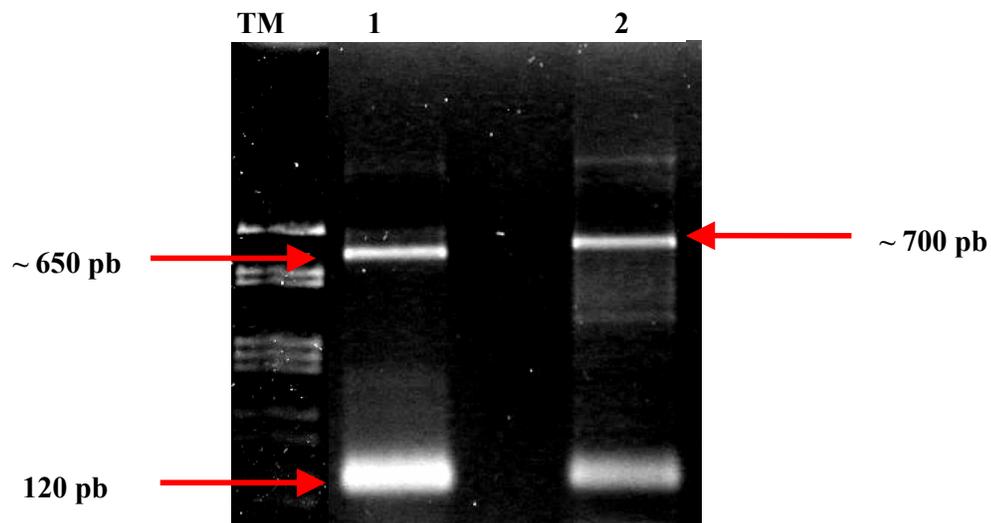


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão (Low Melting) a 2% demonstrando os produtos amplificados via PCR para purificação utilizando o Kit QIAquick Gel Extraction Kit[®] (Qiagen, Valencia). TM= Padrão de tamanho molecular (pUC 18 digerido com *Hae* III), 1= La e 2= Lb.

Apesar de terem sido realizadas várias modificações no protocolo do kit, com o intuito de aumentar a eficiência na recuperação de DNA, não se obteve êxito. As seqüências obtidas, através da reação de seqüenciamento destes produtos purificados, foram de baixa qualidade e confiabilidade quando analisadas pelos programas Phred/Phrap/Consed[®] (<http://www.phrap.org>).

Das 40 amostras submetidas a PCR-RFLP, 37 apresentaram a banda de 120 pb. A digestão dos produtos de PCR pela enzima *Hae*III possibilitou a identificação da espécie de *Leishmania* em 36 amostras (Figura12).

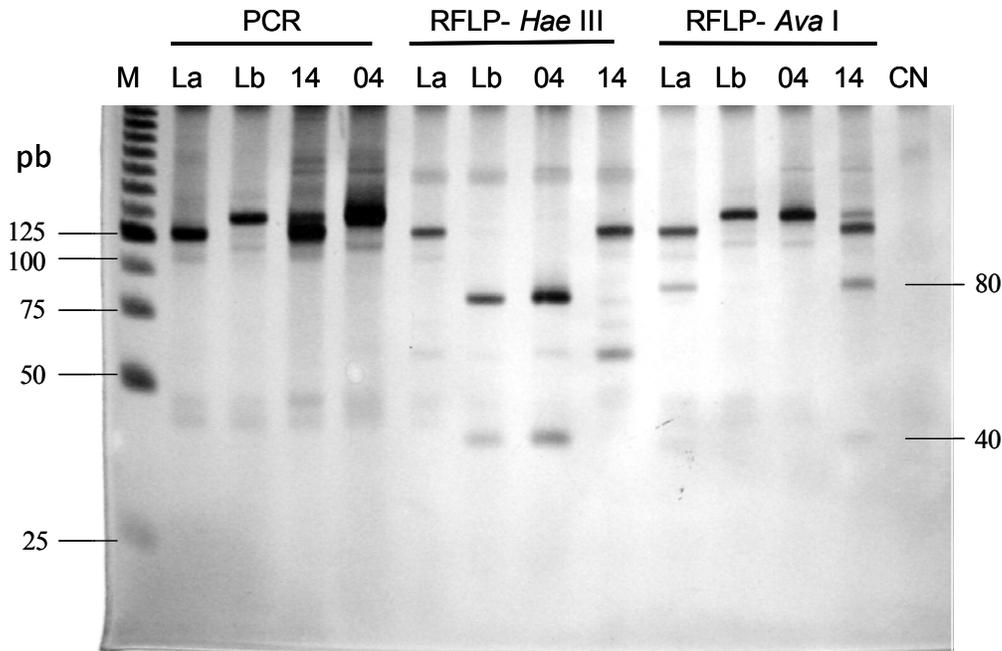


Figura 12: Gel de poliacrilamida a 10% corado pela prata demonstrando o DNA de pacientes com LTA amplificado via PCR com os iniciadores 150 e 152 e submetidos a clivagem com as enzimas de restrição *Hae* III e *Ava* I. pb= pares de base, M= Tamanho molecular, La= *Leishmania amazonensis*, Lb= *Leishmania braziliensis*, 14= amostra paciente 1, 04=amostra paciente 2, CN= Controle negativo.

Dentre as 40 amostras submetidas a PCR e digestão enzimática, em três amostras a PCR foi negativa e 1 amostra não foi clivada pela enzima *Hae*III, específica para *L. braziliensis* e nem pela *Ava*I, específica para *L. amazonensis*. Os resultados demonstraram que 34 pacientes apresentavam leishmaniose devido a infecção por *L. braziliensis*, enquanto apenas 2 pacientes apresentavam quadro de LTA devido a infecção por *L. amazonensis*. Dentre os pacientes que apresentavam *L. braziliensis* como agente etiológico, 21 adquiriram a doença no Estado do Mato Grosso, 2 no Pará, 2 em Rondônia e 4 em outras regiões (RJ, PR, Bahia). Em 6 casos autóctones de Santa Catarina foi identificado *L. braziliensis*, sendo um deles um caso de

leishmaniose mucocutânea. Dos 2 casos de infecção por *L. amazonensis* um foi proveniente do Estado do Mato Grosso e outro da cidade de Piçarras, Santa Catarina (Tabela 5).

Tabela 5: Número de casos de infecção por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* por região de infecção

Região de Infecção	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. amazonensis</i>
Mato Grosso	20	1
Santa Catarina	6	1
Pará	2	-
Rondônia	2	-
Outros	4	-
Total de casos (n= 36)	34	2

6. DISCUSSÃO

Recentemente, o Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina foi reconhecido como Laboratório de Referência no diagnóstico da leishmaniose no Estado de Santa Catarina (Portaria 754/2001 SES-SC). Entretanto, desde o ano de 1993 casos esporádicos da doença vinham sendo atendidos neste laboratório. Ao longo destes 10 anos (1993 a 2003), observou-se um aumento no número de diagnósticos realizados e de casos positivos da doença, associado não a um aumento dos casos de leishmaniose nesta região, mas ao aumento no número de notificações da enfermidade devido a criação de um serviço especializado no atendimento destes pacientes.

A procedência não significa necessariamente o local de infecção do paciente. No presente trabalho, a maioria dos casos de leishmaniose atendidos são importados de outros Estados, principalmente das regiões Norte e Centro-Oeste, áreas altamente endêmicas para a doença (GONTIJO & CARVALHO, 2003; RODRIGUES et al., 2002; ROMERO et al., 2002; OLIVEIRA-NETO et al., 2000).

Entre as pessoas que vivem em regiões próximas de áreas endêmicas, são os adultos do sexo masculino que correm maior risco de infecção, uma vez que, desenvolvem atividades rurais ou na mata, agricultura, como extração madeireira, abertura de estradas e manobras militares (GUERRA et al., 2003). No Brasil, na década de 40, a maior epidemia ocorreu durante a construção da estrada de ferro noroeste do Brasil no Estado de São Paulo, onde, estimou-se

que 30.000 pessoas tenham sido infectadas e 9.000 trabalhadores foram tratados para leishmaniose cutânea (KLAUS et al., 1999). A infecção também vêm sendo adquirida durante atividades de campo em estudos biológicos, serviços comunitários em áreas de transmissão ou ecoturismo (WEIGLE & SARAVIA, 1996). Outro modelo de transmissão da leishmaniose é a domiciliar e/ou peridomiciliar, onde animais domésticos como o cão, cavalo, mula e outras espécies existentes nestes ambientes podem servir como reservatórios da doença (MEDEIROS, 1999). Casos raros de transmissão por contato direto, via congênita, e por transfusão sanguínea foram descritas na literatura, envolvendo a forma cutânea e visceral da doença (PEARSON & SOUSA, 1996; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2002,).

O atendimento de maior número de homens e de pessoas com mais de 20 anos mostra um predomínio da infecção em população economicamente ativa, em áreas de transmissão extradomiciliar. Dentre as atividades envolvidas na migração destas pessoas para áreas com risco de infecção está a atividade extrativista madeireira e o turismo. Por outro lado, em áreas domiciliares e peridomiciliares, este tipo de preferência por sexo e idade não é observado (RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2002; CAMPBELL-LEDNUM et al., 2002). Em áreas de colonização antiga e periurbana, a LTA ocorre em mulheres e em todas as faixas etárias, atingindo também crianças (OLIVEIRA-NETO et al., 1988; PASSOS et al., 1993; PASSOS, 1998). No presente trabalho, dos 53 casos suspeitos a leishmaniose foi confirmada em 47 pacientes. Destes, 43 (91%) eram adultos e apenas 4 (9%) eram crianças. O predomínio dos casos ocorreu em indivíduos de sexo masculino (87%) contra 13% no sexo feminino. Estes resultados estão de acordo com os dados relatados na literatura. A

ocorrência de 4 casos autóctones em crianças no município de Piçarras sugere que a transmissão da doença possa estar ocorrendo em nível peridomiciliar. Um levantamento intradérmico realizado em 463 crianças em idade escolar no mesmo município mostrou uma prevalência de intradermorreação positiva de 12,1% (STEINDEL, et al. 2000). Nenhum dos indivíduos com IRDM positiva apresentava lesões ativas ou cicatrizes compatíveis com a doença.

A LTA apresenta um largo espectro de manifestações clínicas, variando desde infecções subclínicas até lesões únicas ou múltiplas localizadas em áreas expostas da pele e nas mucosas (CALDAS et al., 2003; GONTIJO & CARVALHO, 2003; CABELLO, CARABALLO & MILLÁN, 2002; MEHREGAN, MEHREGAN & MEHREGAN, 1999; LIMA FILHO & STEINDEL, 1998).

No presente estudo, a forma clínica mais freqüentemente observada foi a cutânea (50/56), predominantemente única, com aspecto característico, sendo que 4 destes 50 casos eram lesões associadas a outras etiologias (úlceras de estase e carcinoma espinocelular). A localização das lesões cutâneas atingiu preferencialmente membros inferiores e superiores, sendo a distribuição mais encontrada na maioria dos casos (OLIVEIRA-NETO et al., 2000). Apenas um paciente com lesões múltiplas (15 lesões) foi registrado com acometimento de membros superiores, membros inferiores, cabeça e tronco. A disseminação da leishmaniose pode ser explicada por dois mecanismos. O primeiro é a ocorrência de várias picadas pelo inseto vetor e a segunda é a disseminação linfática e hematogênica, que explica a presença de lesões múltiplas que ocorrem em uma trajetória linear no mesmo segmento corpóreo.

A leishmaniose mucosa (LM), apesar de ser um quadro clínico menos freqüente na leishmaniose, é geralmente mais agressiva para o paciente e

apresenta a possibilidade de seqüelas graves e está geralmente associada à *L. braziliensis* (PASSOS, 1998). Os fatores que contribuem para que uma doença inicialmente cutânea evolua para essa forma tardia não são de todo conhecidos, mas associa-se o fato a demora na cicatrização da lesão cutânea primária e ao tratamento inadequado (GONTIJO & CARVALHO, 2003). Seis pacientes do grupo avaliado na presente pesquisa apresentaram esta manifestação clínica da doença, onde em 4 casos foi visível a presença de cicatriz de lesão cutânea primária. Em dois pacientes com a forma mucosa foram observadas perfurações do septo nasal e do palato, que necessitaram de intervenção cirúrgica posterior.

As leishmanias assim como outros parasitas têm sido considerados parasitas oportunistas em pacientes imunocomprometidos, como os pacientes com o vírus HIV, que vivem em áreas endêmicas. A maioria dos pacientes com co-infecção *Leishmania*-HIV apresenta manifestações clínicas atípicas como leishmaniose cutânea disseminada, lesões cutâneas incomuns, lesões mucosas contendo abundantes formas amastigotas (Da SILVA et al., 2002). Além disso, observa-se com certa freqüência o envolvimento cutâneo causado por parasitas viscerotrópicos e envolvimento visceral ocasionado por parasitas dermatotrópicos (Da SILVA et al., 2002). No presente estudo, dois casos de leishmaniose mucocutânea estavam associados a imunossupressão e imunodeficiência, onde um dos pacientes apresentava Linfoma de Hodgkin e outro co-infecção *Leishmania*-HIV. Um outro caso de coinfecção *Leishmania*-HIV apresentou um quadro disseminado com centenas de nódulos não ulcerados ricos em amastigotas. Em todos os casos o agente etiológico identificado foi a *L. braziliensis*.

O tempo de evolução das lesões variou de 15 dias a quatro anos para os pacientes incluídos no presente trabalho, onde muitos destes casos apresentavam um tempo médio de evolução de 7,6 meses. A demora na procura por atendimento especializado pode ser atribuída em parte ao desconhecimento da doença pelo paciente e pelo serviço médico local, ou então, pela automedicação ou tratamentos inespecíficos ou alternativos freqüentemente prescritos (MOREIRA et al., 2002). Neste caso, enfatiza-se a importância de se realizar um programa de treinamento dos profissionais da área de saúde em regiões de baixa transmissão da doença.

A detecção do parasita pelo exame direto corado pelo Giemsa é um método bastante simples, barato, mas sua sensibilidade é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão (MEDEIROS, RODRIGUES & ROSELINO, 2002; MOTAZEDIAN et al., 2002; BELLI et al., 1998). Apesar do grande tempo de evolução da maioria dos casos atendidos, obtivemos 80% de positividade quando empregada a microscopia como método diagnóstico. Deve-se salientar que a sensibilidade da técnica depende em grande parte da experiência do microscopista e do número de campos microscópicos examinados. No presente estudo foram examinados 500 campos microscópicos por lâmina totalizando 1.500 campos/paciente. O tempo médio de duração para realização da microscopia foi de aproximadamente 2 horas/paciente. Por ser uma etiologia de baixa prevalência em Santa Catarina, os profissionais de saúde não são adequadamente capacitados para detecção do parasita.

A intradermorreação de Montenegro (IDRM) é de grande valor presuntivo no diagnóstico de LTA, constituindo valioso recurso diagnóstico nos casos em

que os parasitas são escassos ou ausentes, sendo também bastante útil nos inquéritos epidemiológicos de áreas endêmicas.

Segundo GONTIJO & CARVALHO (2003), a estimativa de positividade da IDRM é de 84% a 100% nas formas cutâneas e mucocutâneas, respectivamente, e o teste apresenta resultados negativos na forma cutânea difusa e nos pacientes imunodeprimidos. Considerando os resultados positivos de microscopia e PCR a sensibilidade da IDRM neste grupo de pacientes foi de 100%. Os pacientes que não responderam ao inóculo do antígeno apresentavam lesões de outras etiologias como úlcera de estase, carcinoma espinocelular, esporotricose e carcinoma basocelular. O teste de Montenegro não distingue doença de infecção, nem infecção corrente de infecção passada (BELLI et al., 1998).

Em virtude das limitações encontradas no emprego das técnicas clássicas de diagnóstico da leishmaniose (HARRIS et al., 1998), no presente trabalho, adotou-se a técnica da PCR no intuito de aumentar a sensibilidade do teste e padronizar o diagnóstico molecular para a detecção e identificação dos parasitas do gênero *Leishmania*, implementando-a na rotina de diagnóstico do laboratório de referência e também gerando dados de interesse epidemiológico.

A amplificação via PCR constitui-se numa alternativa prática e vantajosa por ser um método altamente sensível e específico na detecção, caracterização e identificação de *Leishmania* sp. em amostras clínicas, reservatórios e vetores infectados (MÜLLER et al., 2003; WEIGLE et al., 2002; MINODIER et al., 1997; MICHALSKI et al., 2002). Entretanto, os protocolos padrões de uma reação de PCR nem sempre são apropriados e, portanto, devem ser otimizados levando-

se em conta a seqüência alvo a ser amplificada, os iniciadores, tampões, enzimas, entre outros (INNIS et al., 1990).

Alguns autores utilizam iniciadores gênero (MEDEIROS, RODRIGUES & ROSELINO, 2002; MOTAZEDIAN et al., 2002) ou subgênero específicos (BASTRENTA et al., 2003; WEIGLE et al., 2002; ANDRADE et al., 2001) direcionados a região conservada ou ao minicírculo inteiro do kDNA, como alvo no diagnóstico da leishmaniose. A maior atenção no processo de padronização de uma reação de PCR deve ser em relação aos pares de iniciadores, cuja seqüência determina a temperatura de ligação e, por conseqüência, a estringência da reação de PCR (HILLIS, MORITZ & MABLE, 1996). No presente trabalho, utilizando iniciadores descritos na literatura, contendo modificações, foi realizada a padronização da PCR para a amplificação da região conservada do kDNA de três espécies de *Leishmania*, com o intuito de aumentar a estringência da reação sem diminuir a sensibilidade da mesma.

Após a determinação das concentrações ideais do tampão de reação e das condições de temperatura dos ciclos de amplificação, observou-se a geração de produtos de 120 pb, tanto em amostras dos controles positivos como em amostras de pacientes positivos para leishmaniose, utilizando os iniciadores L-kDNA-1 e L-kDNA-2.

Avaliando-se os resultados do experimento de gradiente de temperatura, observamos a amplificação de uma banda de tamanho superior a 120 pb e que, além disso, apresentou tamanhos distintos para *L. amazonensis* (650 pb), *L. braziliensis* (700 pb) e *L. chagasi* (800 pb) utilizadas como controles positivos nas reações de PCR. O aumento da temperatura de ligação dos iniciadores

permitiu a amplificação de fragmentos de DNA de tamanho superior sem prejudicar a amplificação do fragmento de 120 pb.

De acordo com a literatura, os minicírculos perfazem 95% do kDNA total e apresentam um tamanho que varia de 0,5 – 2,5 kb. Estes minicírculos formam um grupo heterogêneo, compreendendo um número de diferentes classes com variabilidade nas suas seqüências de DNA, variando entre as espécies da Ordem Kinetoplastida (BREWSTER & BARKER, 2002, YURCHENKO et al., 1999). De acordo com esta informação, os fragmentos com tamanho aproximado de 650, 700 e 800 pb, observados em nossos resultados, correspondem a amplificação do minicírculo total do kDNA de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*.

Esta diferença no tamanho da seqüência completa do minicírculo de kDNA foi de fácil visualização com a resolução dos produtos amplificados em gel de agarose a 2,5%. A presença das bandas correspondentes ao minicírculo total também foi observada na amplificação de amostras de biópsia de pele provenientes de pacientes, o que possibilitaria distinguir-se entre as espécies de *Leishmania* responsáveis pela infecção. Entretanto, faz-se necessário ensaios de hibridação para confirmar a especificidade deste fragmento amplificado. A PCR utilizando os iniciadores L-kDNA-1 e L-kDNA-2 testados no presente trabalho pode se constituir em uma ferramenta adicional na identificação específica de amostras isoladas de *Leishmania* sp. No entanto, estudos adicionais com um maior número de espécies necessita ser feito. RODRIGUES e colaboradores (2002), avaliaram a PCR como técnica no diagnóstico de LTA, em uma região endêmica no Estado de Pernambuco. Os autores utilizaram dois pares de iniciadores, um específico para o gênero

Leishmania, dirigido à região conservada do minicírculo de kDNA gerando um produto de 120 pb e outro específico para o subgênero *Viannia*, gerando um produto de 750 pb, correspondente ao minicírculo total. A identificação específica do parasita foi realizada através de hibridização.

De acordo com MARFURT et al. (2003a) a quantidade de DNA genômico de uma *Leishmania* equivale a 100 fg. HARRIS et al. (1998), em ensaios de sensibilidade na detecção de *Leishmania*, utilizando iniciadores para o gene do mini-exon ou spliced leader, em diluições seriadas de 10 vezes, verificou a detecção de DNA em uma concentração de até 1 fg para as leishmanias do complexo *L. braziliensis*, 1 a 10 pg para o complexo *L. mexicana* e 10 pg para os parasitas do complexo *L. donovani*. Em nossos experimentos, a sensibilidade dos iniciadores L-kDNA-1 e L-kDNA-2 foi a mesma para todas as espécies testadas (2 fg de DNA do parasita).

No ensaio de reconstituição observamos que, mesmo na presença de concentrações elevadas de DNA humano foi possível detectar DNA de *Leishmania* sp., mostrando que não houve inibição da amplificação devido ao excesso de DNA presente na reação e que os iniciadores são eficientes para o diagnóstico da doença utilizando-se biópsias de pele.

Verificamos que no controle negativo, utilizando apenas DNA humano como molde nas reações de PCR, ocorreu amplificação de vários fragmentos de tamanhos distintos, mas que não apresentavam correspondência com as bandas dos controles positivos. Em virtude disso, utilizamos em todas as reações de diagnóstico um padrão de DNA humano para comparação com as amostras de paciente que apresentavam mesmo padrão de bandas. Desta forma, podemos comprovar que, todos os produtos que apareceram na

amplificação das amostras clínicas, que não eram produtos da amplificação do DNA de *Leishmania* sp. (120 pb), eram produtos da amplificação do DNA humano, presente nas mesmas. A amplificação de fragmentos espúrios também foi observada por RODRIGUES et al. (2002) utilizando material de biópsia. Através de hibridização com sondas para kDNA de *Leishmania* sp. os autores mostraram que a maioria dos produtos amplificados com tamanhos diferentes do produto esperado não foram reconhecidos pela sonda marcada. Entretanto, alguns produtos amplificados de tamanho maior que 120 pb que hibridizavam com a sonda estavam relacionados com seqüências do minicírculo.

Quando testada a especificidade dos iniciadores L-kDNA-1 e L-kDNA-2, frente ao DNA de lesões de outras etiologias (úlceras de estase, carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular e esporotricose), observamos um padrão de amplificação semelhante ao observado para o controle de DNA humano. Duas amostras de biópsia, uma de paciente com paracoccidioidomicose e outra de cromomicose, encaminhadas pelo serviço de dermatologia do Hospital Universitário, quando submetidas a PCR mostraram a presença da banda de 120 pb, correspondente a amplificação da região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania* spp. Embora o diagnóstico destes pacientes tenha sido confirmado através de exames micológicos os resultados da PCR sugerem infecções mistas nestes pacientes. MEDEIROS (2002), observou em seus estudos que uma das amostras utilizada como controle negativo, proveniente de um paciente com diagnóstico confirmado para hanseníase, apresentou PCR positiva. Durante a reavaliação do paciente, observou-se que o mesmo apresentava cicatriz sugestiva de úlcera leishmaniótica no membro inferior. Por

isso não se descarta, no presente trabalho, a possibilidade infecção mista (micose x *Leishmania* sp.) nos pacientes portadores de paracoccidiodomicose e cromomicose.

Na ausência de uma técnica considerada padrão ouro para estimar a sensibilidade e a especificidade da PCR no diagnóstico da leishmaniose, aconselha-se a associação das metodologias convencionais, como a microscopia, a intradermorreação, histopatologia e até mesmo critérios clínicos (WEIGLE et al., 2002).

MEDEIROS, RODRIGUES & ROSELINO (2002), comparando a sensibilidade da PCR com a técnica histopatológica na detecção da *Leishmania* em lesões de pele e mucosa, obtiveram positividade em 82% das amostras, utilizando os iniciadores 13A e 13B para a amplificação da região conservada do kDNA. RODRÍGUEZ et al. (1994), avaliando a eficácia da PCR no diagnóstico da leishmaniose, utilizando os mesmos iniciadores obtiveram 97% de resultados positivos contra 63% de positividade em esfregaços corados pelo Giemsa. A porcentagem de positividade da reação da PCR, utilizando-se os iniciadores L-kDNA- 1 e L-kDNA- 2, foi 74,4% contra 80% da microscopia e 84,4% da IDR. Embora a PCR tenha detectado DNA de *Leishmania* em apenas 38 pacientes entre 44 com microscopia positiva, a técnica foi capaz de detectar 3 casos positivos entre 11 pacientes com microscopia negativa. Associando a microscopia à técnica da PCR a sensibilidade de detecção utilizando os iniciadores L-kDNA-1 e L-kDNA-2, em nossas condições, foi de 88%. A técnica de PCR não se mostrou muito sensível (63% a 80%) ou específica (60%) no diagnóstico da LTA em biópsias provenientes de pacientes, quando testada por alguns autores (de BRUJIN & BARKER, 1992;

MATHIS & DEPLAZES, 1995). Ao contrário, RODRIGUES et al. (2002), obteve uma sensibilidade de 95,4% e especificidade de 100% da PCR em amostras de pacientes. A possível explicação para os resultados falso-negativos podem ser atribuídos a baixa carga parasitária, instabilidade do DNA extraído ou a qualidade da amostra de DNA, que podem apresentar diferentes concentrações de inibidores da DNA polimerase.

A busca por métodos de coleta de material para PCR, que sejam mais práticos e menos agressivos, tem sido o objetivo de alguns autores. RAMIREZ et al. (2002), no intuito de avaliar se o método e o local de coleta da amostra influenciariam no diagnóstico da LTA e, contrariando a técnica habitual, concluíram que o diagnóstico é significativamente mais eficiente, tanto para a microscopia quanto para a PCR, quando a amostragem é realizada no centro e não na borda da lesão. MIMORI e colaboradores (2002), coletando exsudato da lesão com uma haste de algodão obtiveram uma sensibilidade de 93,8%, utilizando iniciadores subgênero específicos, V1 e V2 para os parasitas do subgênero *Viannia* e L1 e L2 para o subgênero *Leishmania*, e espécie específicos b1 e b2 para *L. (V.) braziliensis*; p1 e p2 para *L. (V.) panamensis*; g1 e g2 para *L. (V.) guyanensis*; m1 e m2 para *L. (L.) mexicana* e a1 e a2 para *L. (L.) amazonensis*.

A variação na positividade da PCR, testada por MARQUES et al. (2001), no diagnóstico da LTA de 164 amostras submetidas a diferentes formas de preservação (papel filtro, papel de nitrocelulose, imersão em etanol 70% e congelamento) e de extração de DNA (eluição e digestão enzimática) não apresentou diferenças significantes, o que confirma a viabilidade de se trabalhar com metodologias simplificadas de coleta, preservação e extração de

DNA de amostras clínicas de pacientes com leishmaniose. No presente estudo, a PCR das amostras preservadas em etanol 70% e submetidas a extração de DNA por fenol-clorofórmio foi mais eficiente ($P < 0,05$) do que a de amostras preservadas em papel de nitrocelulose com extração de DNA por eluição. A quantidade de material preservado em papel de nitrocelulose é muito inferior a preservação de um fragmento inteiro de lesão e, em pacientes com tempo de evolução da doença muito longo e com parasitemia baixas, reduzindo a probabilidade de se encontrar DNA do parasita utilizando esta forma de preservação. Apesar da coleta em papel de nitrocelulose facilitar a extração de DNA, a sensibilidade da PCR caiu cerca de 10,42% em relação a preservação da biópsia em etanol 70%. Como a preservação do material em papel de nitrocelulose não exclui a realização da biópsia, adotamos apenas a preservação em etanol 70%.

MINODIER e colaboradores (1997), desenvolveram um teste para a identificação específica das leishmanias do Velho Mundo. O teste consiste na comparação das seqüências dos produtos de PCR, obtidos da amplificação do DNA do parasita proveniente de pacientes, com seqüências genômicas depositadas num banco de dados. Para a reação de seqüenciamento, os autores utilizaram uma concentração de 250 a 500 ng de DNA purificado. Além disso, a clivagem dos produtos da PCR com a enzima *HaeIII*, foi utilizado pelos autores para a identificação dessas mesmas amostras. No presente trabalho, apesar das sucessivas tentativas de purificação de produtos da PCR utilizando kit comercial, a concentração de DNA recuperado foi insuficiente para a realização do seqüenciamento. Apesar da mesma metodologia ser utilizada para a purificação do DNA de outros organismos e correntemente utilizada em

nosso laboratório, para a purificação do DNA de *Leishmania* sp., não se obteve o rendimento esperado.

A principal forma de identificação das espécies de *Leishmania* é a eletroforese de isoenzimas (CUPOLILLO, GRIMALDI-JR & MOMEN, 1994). No entanto, este método requer quantidades massivas de parasitas obtidos de cultura, técnicos treinados e laboratórios de referência, não disponíveis nas áreas endêmicas. A PCR-RFLP apresenta-se como um método alternativo mais simplificado que a hibridização com sondas específicas e hábil na diferenciação das espécies relevantes do parasita em amostras clínicas (MARFURT et al., 2003b).

VOLPINI e colaboradores (2004), utilizando iniciadores direcionados a região conservada do kDNA, que produzem fragmentos de 120 pb para *L. braziliensis* e 116pb para *L. amazonensis*, após digestão com a enzima *Hae* III, obtiveram fragmentos de 40 pb e 80 pb para *L. braziliensis*, não havendo digestão do fragmento de 116 pb de *L. amazonensis*, permitindo, desta forma, a distinção entre as espécies. Utilizando a mesma metodologia, no presente trabalho, verificou-se a predominância de *L. braziliensis* (34 amostras) como espécie causadora da LTA no Estado de Santa Catarina. Dois casos estavam relacionados a infecção por *L. amazonensis*, sendo um caso importado do Mato Grosso e outro caso autóctone do município de Piçarras/SC. Estudos anteriores utilizando a imunofluorescência com anticorpos monoclonais e PCR-hibridização com sondas específicas mostraram a presença de *L. amazonensis* em dois casos autóctones (Municípios de Quilombo e Coronel Freitas) na região Oeste do Estado e a presença de *L. braziliensis* em casos autóctones

nos Municípios de Chapecó e Piçarras, nas regiões oeste e nordeste do Estado respectivamente (GRISARD et al. 2000).

Dos 34 pacientes com infecção por *L. braziliensis*, 25 apresentavam de uma a duas lesões ulceradas, 4 apresentavam mais de 3 lesões, 4 apresentaram a forma mucocutânea e um apresentava a forma disseminada da doença. Os dois casos de infecção por *L. amazonensis* foram de lesão única. Neste estudo, verificamos o primeiro caso de leishmaniose mucocutânea autóctone em uma paciente do Município de Penha na região nordeste do Estado. Estudos preliminares sobre a fauna de flebotomíneos no Município de Piçarras têm mostrado a presença de 4 diferentes espécies (*Lutzomyia neivae*, *L. lanei*, *L. ayrozai* e *L. fischeri*) no ambiente silvestre e peridomiciliar (C.B. Marcondes, comunicação pessoal). A transmissão de *L. amazonensis* está estreitamente relacionada ao vetor *Lutzomyia flaviscustellata* (LAINSON & SHAW, 1987). Os dados epidemiológicos do paciente do município de Piçarras, portador de leishmaniose devido a *L. amazonensis*, mostram que o paciente é natural do Município de Xanxerê, oeste do Estado e que reside em Piçarras há 9 anos. Face a existência de *L. amazonensis* na região oeste do Estado é possível que este paciente tenha vindo infectado e desenvolveu a doença posteriormente. Por outro lado, torna-se necessário aprofundar a investigação deste caso no sentido de esclarecer o local de infecção. Além disso, faz-se necessário realizar um estudo pormenorizado da fauna de flebotomíneos no Estado de Santa Catarina.

A falha na amplificação de 3 amostras, mesmo após várias tentativas, pode ser decorrente de degradação do DNA das amostras. Uma amostra amplificada, apresentou perfil de restrição indeterminado, não sendo clivada

pela *HaeIII*, específica para *L. braziliensis* e nem pela *AvaI*, específica para *L. amazonensis*. Este resultado sugere que esta amostra pode tratar-se de uma variante de *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*.

O crescente número de casos autóctones da LTA e o aumento na notificação dos casos em Santa Catarina reforçam a necessidade da utilização métodos combinados no diagnóstico de novos casos da doença. Além disso, estudos adicionais são necessários para a identificação de vetores e reservatórios, com o auxílio de técnicas moleculares, fornecendo subsídios para a compreensão da epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado, possibilitando desta forma estabelecer planos de controle e prevenção da doença.

7. CONCLUSÕES

- A taxa de detecção de *Leishmania* sp. via PCR em amostras de biópsia foi semelhante ao do teste parasitológico.
- Além do fragmento de 120 pb (banda diagnóstica), outros fragmentos com tamanho de 650 pb, 700 pb e 800 pb correspondendo ao minicírculo total de kDNA foram detectados em amostras *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*, respectivamente.
- O limite de detecção de DNA de *Leishmania* spp. pelos iniciadores L-kDNA- 1 e L-kDNA- 2 foi de 2 fg.
- A taxa de detecção de *Leishmania* sp. em biópsias de pacientes utilizando a associação da microscopia e PCR foi de 88%.
- O DNA das amostras preservadas em etanol 70%, extraído pelo fenol-clorofórmio, foi a metodologia que apresentou maior positividade na pesquisa de *Leishmania* sp. via PCR.
- *Leishmania braziliensis* e *L. amazonensis* foram identificados como espécies causadoras da LTA, autóctone e não autóctone, em pacientes do Estado de Santa Catarina.

8 - Referências Bibliográficas

AGUILLAR, C. M. et al. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Brazil and Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 1, p. 19-28, 1989.

ANDRADE, A. S. R. et al. Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**, v. 78, p. 261-267, 2001.

ANTHONY, R. L; CHRISTENSEN, H. A. & JOHNSON, C.M. Immunoborbsent assay (ELISA) for the serodiagnosis of New World Leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, p. 190-194, 1980.

BARRETO, G.; VAGO, A. R.; GINTHER, C.; SIMPSON, A. J. G. & PENA, S. D. J. Mitochondrial D-loop "signatures" produced by low-stringency single specific primer PCR constitute a simple comparative human identity test. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 58, p. 609-616, 1996.

BASTRENTA, B. et al. Human mixed infections of *Leishmania* spp. and *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a sub Andean Bolivia area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 2, p. 255-264, 2003.

BELKUN, A. Low-stringency single specific primer PCR, DNA sequencing and single-strand conformation polymorphism of PCR products for identification of genetics variants of human papilomavirus type 16. **J. Vir. Methods**, v. 55, p. 435 – 443, 1995.

BELLI, A. et al. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n. 1, p. 102-109, 1998.

BREWSTER, S. & BAKER, D.C. Analysis of minicircle classes in *Leishmania (Viannia)* species. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, suppl. 1, p. 51-63, 2002.

CABELLO, I. CARABALLO, A. & MILLÁN, Y. Leishmaniasis in the genital área. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 105-107, 2002.

CALDAS, J. M. et al. Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case report. **Acta Tropica**, v. 88, p. 39-43, 2003.

CAMPBELL-LEDNUM, D. et al. Domestic e peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 2, p. 159-162, fev. 2002.

CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L. V. & FERNANDES, J. F. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. **J. Protozoology**, v. 14, p. 447-451, 1967.

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

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI-JR, G. & MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, p. 296-312, 1994.

CUPOLILLO, E. et al. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 73, p. 145-155, 1995.

CUPOLILLO, E., MOMEN, H. & GRIMALDI Jr, G. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 5, p. 663-668, 1998.

CUPOLILLO, E. et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3126-3132, July, 2003.

Da SILVA, E. S. et al. P. Visceral Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n.3, p. 145-149, 2002.

De BRUJIN, M. H. & BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, v. 52, p. 45-48, 1992.

De CASTRO, E. A. et al. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do

Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 445-452, set/out, 2002.

DEDET, J. P. & PRATLONG, F. Leishmaniasis. In: GORDON, C. C. & ZUMLA, A. **Manson's Tropical Disease**, 21^aed., Elsevier Science, 1847p., 2003.

DEDET, J.P. et al. The Parasite. **Clinics in Dermatology**, New York , NY, v. 17, p. 261-268, 1999.

DEGRAVE, W. et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of **Leishmania** – a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n.3, p. 463-469, 1994.

DESJEUX, P. - Leishmaniasis, public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, New York, NY, v.14, p. 417-23, 1996.

FALQUETO, A. et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 2, p. 155-163, 1986.

FERNANDES, O. et al. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania (Viannia)*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 3, p. 279-284, 1996.

FERNANDES, O.: MURTHY, V. K.: KURATH, U: DEGRAVE, W. M. & CAMPBELL, D. A. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 66, p. 261-271, 1994.

FERNANDES, O.: DEGRAVE, W. & CAMPBELL, D.A. The mini-exon gene: a molecular marker for *Endotrypanum schaudanni*. *Parasitology*, v. 107, p. 219-224, 1993.

FURTADO, T. A. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 55, n. 2, p. 81-86, 1980.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P.; MELO, L. A., GENARO, O. & LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**, 10^a ed. , São Paulo, Atheneu, cap.8, p.36-53, 2000.

GONÇALVES, C. C. M; REICHE, E. M; ABREU FILHO, B. A. et al. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a western blot for diagnosis of

American Tegumentary Leishmaniasis. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, v. 66, n. 1, p. 91-102, 2002.

GONTIJO, B. & De CARVALHO, L. B. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 71-80, jan./fev. 2003.

GRIMALDI- JR, G. & TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Review**, v. 6, p. 230-250, 1993.

GRIMALDI-JR, G. - Leishmanioses tegumentares: aspectos clínicos e imunopatológicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 77, n. 2, p. 195-215, 1982.

GRISARD, E. C. Estudo da variabilidade do gene do mini-exon e produção de cepas transfectadas de *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. Universidade Federal de Minas Gerais, MG. **Tese de Doutorado**. 206 p., 1999.

GRISARD, E. C., et al. Characterization of *Leishmania sp.* Strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. **Acta Tropica**, v. 74, p. 89-93, 2000.

GUERRA, J. A. O. et al. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 587-590, set/out, 2003.

GULL, K. The biology of kinetoplastid parasites: insight and challenges from genomics and post-genomics. **Intern. J. Parasitol.**, v. 31, n. 5-6, p. 443-452, 2001.

HARRIS, E. et al. Single-Step Multiplex - PCR Assay for Characterization of New World *Leishmania* Complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1989-1995, 1998.

HILLIS, D. M.; MORITZ, C. & MABLE, B. K. *Molecular Systematics*. 2nd ed. Sunderland, Massachusetts, USA; Sinauer Associates, 1996, 655 p.

<http://www.who.int/emc/disease/leish/leisgeo1.html>. Acesso em: 21/09/2002.

<http://www.funasa.org.br>. Acesso em: 23/11/2003.

INNES, M. et al. PCR protocols – A guide to methods and applications. 1 ed. New York: Academic Press, 1990. 482 p.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 123-152, 1995.

KLAUS, S.; FRANKENBURG, S. & INGBER, A. Epidemiology of cutaneous Leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 17, p. 257-260, 1999.

KILLICK-KENDRICK, R. The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. **Clinics in Dermatology**, New York, NY, v. 17, p. 279-289, 1999.

LAISON, R. & SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W., KENDRICK, K. **The Leishmaniases in Biology and Medicine**, 2.ed., Londres, London Academic Press, 1, cap.1, p.1-128, 1987.

LIMA FILHO, J. H. C. & STEINDEL, M. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose cutânea no Estado de Santa Catarina. **Arq. Cat. Med.**, v. 27, n. 1-4, p. 25-31, jan/dez, 1998.

MACHADO, E. M. M. et al., A simplified method for sample collection and DNA isolation for polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 6, p. 863-866, nov./dez., 2000.

MAGALHÃES, A. V., et al. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. Padrões histológicos e estudo evolutivo das lesões. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 253-262, 1986.

MARFURT, J. et al. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 46, p. 115-124, 2003a.

MARFURT, J. et al. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology** v. 41, n. 7, p. 3147-3153, july, 2003b.

MARQUES, M. J. et al. Simple form of clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 6, p. 902-906, 2001.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SABROZA, P. C.; SOUZA, W. J. S. Reação de imunofluorescência indireta e intradermoreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados obtidos em 1974 e 1978. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 22, p. 149-155, 1998.

MARZOCHI, M. C. A. & MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil-emerging Anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10 (supl.2), p. 359-375, 1994.

MARZOCHI, M. C. et al. Reação de imunofluorescência indireta e intradermoreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados obtidos em 1974 e 1978. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 22, p. 149-155, 1980.

MATHIS, A. & DEPLAZES, P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. **Journal Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1145-1149, 1995.

MEDEIROS, A.C.R. & ROSELINO, A.M.F. – Leishmaniose tegumentar Americana: do histórico aos dias de hoje. **An Bras Dermatol**, v. 74, p. 329-36, 1999.

MEDEIROS, A. C. R. Análise filogenética das espécies de *Leishmania* implicadas na leishmaniose tegumentar americana em pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da faculdade de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Janeiro de 1993 a Junho de 2002). 2002. 115f. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Ribeirão Preto.

MEDEIROS, A.C.R.; RODRIGUES, S.S. & ROSELINO, A.M.F. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of leishmania for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 35, p. 421-424, 2002.

MEHREGAN, D. R.; MEHREGAN, A. H. & MEHREGAN, D. A. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 17, p. 297-304, 1999.

MICHALSKY, E. M. et al. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimental infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 5, p. 255-259, sep/out, 2002.

MIMORI, T. et al., Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. **Acta Tropica**, v. 81, p. 197-202, 2002.

MINODIER, P. et al. Rapid identification of causative species in patients with old world leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2551-2555, out, 1997.

MONROY-OSTRIA, A.; HERNANDEZ-MONTES, O. & BARKER, D. C. Aetiology of visceral leishmaniasis in Mexico. **Acta Tropica**, v. 75, p. 155-161, 2000.

MOREIRA, R. C. R. et al. Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, p. 187-195, jan/fev, 2002.

MOTAZEDIAN, H. et al. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 96, n. 1, p. 31-34, 2002.

MÜLLER, N., et al. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. **Veterinary parasitology**, v. 114, p. 223-229, 2003.

MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzimol.**, v. 155, p. 335 – 350, 1987.

OLIVEIRA-NETO, et al. An outbreak of american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 4, p. 427-435, out/dez 1988.

OLIVEIRA-NETO, M. P., et al. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. **International Journal of Dermatology**, v. 39, p. 506-514, 2000.

PASSOS, V. M. A. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 72, p. 251-258, 1999.

PASSOS, V. M. A. Leishmaniose Tegumentar Americana: Caracterização Clínica, Evolutiva, Laboratorial E Epidemiológica (Belo Horizonte, 1989-1995). Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. **Tese de Doutorado**.188p, 1998.

PASSOS et al. Epidemiological aspects of American Cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the Metropolitan Region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, p. 103-110, 1993.

PEARSON, R.D. & SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.22, p. 1-13, 1996.

PIRMEZ, C. et al. Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p. 1819-1823, 1999.

RAMÍREZ, J. R. et al. The method used to sample ulcers influences the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 96 Suppl. 1 S1/169- S1/ 171, apr. 2002.

RAMOS, A. et al. Detection and identification of human pathogenic *Leishmania* and *Trypanosoma* species by hybridization of PCR-amplified mini-exon repeats. **Experimental Parasitology**, v. 82, p. 242-250, 1996.

RAMOS-E-SILVA, M. & JACQUES, C.M.C. Leishmaniasis and other Dermatozoonoses in Brazil. **Clinics in Dermatology**, New York, NY, v. 20, p. 122-134, 2002.

RODGERS, M. R., POPPER, S. J. & WIRTH, D. F. Amplification of Kinetoplast DNA as a Tool in the Detection and Diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v.71, p. 267-275, 1990.

RODRIGUES, E. H. G. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in área of endemicity in northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3572-3576, 2002.

RODRÍGUEZ, N. et al. Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis and Species Discrimination of Parasites by PCR and Hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2246-2252, 1994.

ROGERS, W. O.; BURNHEIM, P. F. & WIRTH, D. F. Detection of *Leishmania* within sand flies by kinetoplast DNA hybridization. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 39, p. 434-439, 1988.

ROMERO, G. A. S. et al. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. **Acta Tropica**, v. 79, p. 225-229, 2001.

ROMERO, G. A. S., et al. Identification of antigenically distinct populations of *Leishmania (Viannia) guyanensis* from Manaus, Brazil, using monoclonal antibodies. **Acta Tropica**, v. 82, p. 25-29, 2002.

SAFAEI, A.; MOTAZEDIAN, M. H. & VASEI, M. Polymerase chain reaction for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in histologically positive, suspicious and negative skin biopsies. **Dermatology**, v. 205, p. 18-24, 2002.

SAIKI, R. F. et al. Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SALMAN, S.M.; RUBEIZ, N. G. & KIBBI, A. G. Cutaneous Leishmaniasis: Clinical Features and Diagnosis. **Clinics in Dermatology**, New York, NY, v.17, p. 291-296, 1999.

SAMBROOK, J. FRITCH, E. F. & MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. V. 3 2nd edition. , New York; Cold Spring Harbor, 2001.

SÃO THIAGO, P. & GUIDA, U. Leishmaniose tegumentar no oeste do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 4, p. 201-203, out./dez, 1990.

SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 145-149, 2002.

STEINDEL, M., LIMA FILHO, J. H. C., RANGEL, R. C. T., KOERICH, L. B., GRISARD, E. C. Report of the southernmost foci of human cutaneous leishmaniasis in Brazil In: XV International Congress for Tropical Medicine and Malaria, 2000, Cartagena de Indias, Colombia. **Abstracts**, v.2, p.115 -115, 2000.

ULIANA, S. R. B. et al. Discrimination against *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. **Journal of Eukariotic Biology**, v. 4, n. 4, p. 324-330, 1994.

VEXENAT, A. C.; SANTANA, J. M. & TEIXEIRA, A. R. L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoan *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 177-185, 1996.

VOLPINI, A. C. et al. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 90, p. 31-37, 2004.

WEIGLE, K. A. et al. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 601-606, 2002.

WEIGLE, K. & SARAVIA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 14, p. 433-450, 1996.

WEISS, J. B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 113-130, jan., 1995.

WIRTH, D. F. & MCMAHON-PRATT, D. Rapid Identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v.77, p. 6810-6814,

YURCHENKO, V. Y. et al. Structure of *Leishmania* minicircle kinetoplast DNA classes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37. n. 5, p. 1656-1657, may, 1999.