

MANOEL SEBASTIÃO DA COSTA LIMA JUNIOR

***Leishmania*: caracterização molecular, PCR em tempo real para o diagnóstico da leishmaniose visceral e diversidade genética de kDNA**

**CAMPO GRANDE
2011**

MANOEL SEBASTIÃO DA COSTA LIMA JUNIOR

***Leishmania*: caracterização molecular, PCR em tempo real para o diagnóstico da leishmaniose visceral e diversidade genética de kDNA**

Tese apresentada como exigência para a obtenção do título de doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria de Fatima Cepa Matos

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Elizabeth Cavalheiros Dorval

**CAMPO GRANDE
2011**

Dedico este trabalho a todas as vítimas da leishmaniose no estado de Mato Grosso do Sul, que vivenciaram o sofrimento, o desleixo com a saúde pública e o descaso com a vida.

AGRADECIMENTOS

À VIDA, o meu muito obrigado, por tudo que ela me concedeu e tem me concedido.

A toda minha família pelo estudo, apoio e ensinamentos.

À minha esposa Shirley e meus filhos Gabriel, Daniel e Ruth pelo amor, compreensão, inspiração e estímulo para continuar a jornada.

À minha querida orientadora Professora Dr^a Maria de Fatima Cepa Matos, pelo apoio durante todo o trabalho, por acreditar na minha capacidade, ensinamentos, profissionalismo, atenção e amizade.

Ao amigo Prof. Dr. Renato Andreotti pelo muito que fez por mim desde os primeiros passos na ciência, pela proteção para crescer, por todas as conversas científicas e pessoais, pela amizade, pela segurança e estímulo.

À coorientadora Prof^a Dr^a Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval, pelo valioso conhecimento em parasitologia em particular sobre as leishmanioses, pelas amostras analisadas, competência, apoio, incentivo e participação imprescindível.

À médica veterinária e técnica do laboratório da UFMS, Elisa Teruya Oshiro pelo ensinamento e prática da cultura de *Leishmania*.

Ao professor Dr. Paulo Ribolla da UNESP de Botucatu, pela contribuição na genética, pelos ensinamentos, boa vontade e disposição.

Ao Dr. Diego Peres Alonso da UNESP de Botucatu pelo apoio, execução das técnicas moleculares, contribuição científica na genética e solicitude.

À bióloga e amiga Edmárcia Elisa Souza pela ajuda e por ter facilitado o estabelecimento da parceria com a UNESP de Botucatu através do professor Dr. Paulo Ribolla.

À Prof^a Dr^a. Sonia Maria Oliveira de Andrade pela, paciência, torcida e orientações.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da UFMS, pelos ensinamentos, orientações e pela rica formação profissional que recebi.

Ao médico e professor Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha pela iniciativa, coragem, competência, responsabilidade social, pelo grande poder agregador de pessoas, o que o permitiu abrir o programa de pós-graduação em doenças infecciosas e

parasitárias da UFMS e a chegada da FIOCRUZ no estado do Mato Grosso do Sul.

À Prof^a Dr^a Elenir Rose Jardim Cury Pontes pela compreensão e análise estatística.

À enfermeira e amiga M.Sc. Angelita Fernandes Druzian, pelo companheirismo e a contribuição com informações sobre os casos de leishmanioses do Hospital-Dia Prof^a Esterina Corsini.

À aluna de graduação Denielly Christina Rodrigues Zorzenon do curso de farmácia pelo companheirismo e ajuda nas extrações de DNA e PCR.

À bióloga e Prof^a Dr^a Aline Pedroso Lorenz Lemke Lorenz pela preciosa ajuda na área de bioinformática e genética molecular.

À graduanda do curso de biologia Andressa Cristina Lopes Hartkopf pela ajuda na análise de bioinformática, extrações de DNA e companheirismo.

Aos meus amigos e colegas da primeira turma de pós-graduação em doenças infecciosas e parasitárias da UFMS pela amizade, união, companheirismo e a alegria que aliviou a nossa caminhada.

Aos amigos e colegas do Instituto Federal de Mato Grosso do Sul – Campus Nova Andradina que compreenderam e apoiaram nesta etapa da vida.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul - FUNDECT pela bolsa de doutorado e pelo financiamento dos projetos envolvidos em minha tese.

"O mundo é um lugar perigoso de se viver, não por causa daqueles que fazem o mal, mas sim por causa daqueles que observam e deixam o mal acontecer."
(Albert Einstein)

RESUMO

As leishmanioses são um complexo de diferentes enfermidades ocasionadas por distintas espécies do gênero *Leishmania*. Estas doenças de evolução crônica podem afetar a pele, mucosas e vísceras dependendo da espécie de *Leishmania* e da resposta imune do hospedeiro. Os objetivos do presente trabalho foram: identificar por meio da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR as espécies dos agentes etiológicos da leishmaniose visceral e tegumentar em pacientes diagnosticados em Campo Grande-MS; avaliar a PCR em tempo real (PCR-TR) em amostras de sangue periférico para diagnóstico da leishmaniose visceral e detectar variabilidade genética em kDNA de *Leishmania* isolada de pacientes com leishmaniose visceral e/ou cutânea. Foram analisados 39 isolados de *Leishmania* criopreservados, obtidos por meio de aspirado medular e/ou biópsia de lesão, conforme a suspeita clínica. Os isolados foram submetidos à extração de DNA e à PCR com os iniciadores RV1/RV2 para *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*, a1/a2 para a identificação de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e b1/b2 para *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. Foi realizada a análise comparativa entre exames moleculares (PCR-TR - sistema Sybr Green Rox Plus e PCR padrão) em sangue periférico e técnicas parasitológicas (aspirado de medula e cultura). Foram utilizados 100 amostras de sangue periférico provenientes de pacientes com suspeita clínica de leishmaniose visceral. Por meio da cultura obteve-se outros 47 isolados de *Leishmania*, que foram submetidos ao sequenciamento da região ITS e a PCR-RFLP com os iniciadores LINR4/LIN19 e enzimas *RsaI* e *HpaII*. *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* foi a única espécie identificada em 37 casos de leishmaniose visceral. *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* foi identificada em dois isolados de pacientes com diagnóstico de leishmaniose tegumentar. Das 100 amostras analisadas, 65 (65%) foram positivas para PCR, 62 (62%) para PCR-TR e 45 (45%) para o esfregaço de aspirado de medula óssea e das 96 amostras, 13 (13,54%) foram positivas na cultura. A PCR-TR mostrou maior concordância com a PCR (95%) seguida do esfregaço de medula óssea (83,0%) e cultura (53,1%). A análise genética dos 47 isolados de *Leishmania* forneceu 30 genótipos diferentes e pela comparação das regiões ITS1 com as sequências depositadas no *Genbank* foi identificado na maioria das amostras de leishmaniose visceral (44), *L. chagasi* como agente etiológico e nos casos de leishmaniose tegumentar identificou-se *L. braziliensis* e *L. major*. Os resultados confirmaram a possibilidade do uso dos três pares de iniciadores como ferramenta na caracterização de isolados de *Leishmania*, a PCR-TR em sangue periférico mostrou ser uma alternativa de diagnóstico da leishmaniose visceral a partir de amostras coletas por método menos invasivo e a técnica PCR/RFLP detectou elevada variabilidade genética em kDNA de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* de casos humanos de Mato Grosso do Sul.

Palavras-chave: *Leishmania*, PCR, filogenética, cinetoplasto

ABSTRACT

Leishmaniasis is a complex of different diseases caused by different species of *Leishmania*. These diseases of evolution chronic can affect the skin, mucous membranes and viscera depending on the kind of *Leishmania* and the host immune response. The objectives of this study were to determine by the Polymerase Chain Reaction- PCR species of etiologic agents of visceral leishmaniasis and cutaneous in patients diagnosed in Campo Grande-MS, to evaluate the PCR in real time (RT-PCR) in peripheral blood samples for diagnosis visceral leishmaniasis and detect genetic variability in the kDNA *Leishmania* isolated from patients with visceral and cutaneous leishmaniasis. We analyzed 39 cryopreserved *Leishmania* isolates obtained by through bone marrow aspiration and / or biopsy of the lesion, as the suspicion clinic. The isolates were submitted to DNA extraction and PCR with RV1/RV2 primers for *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*, for a1/a2 identification of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and B1/B2 for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. We performed a comparative analysis between molecular tests (RT-PCR - *Rox Plus* system *Sybr Green* and PCR standard) in peripheral blood and parasitological techniques (aspirate marrow and culture). A total of 100 samples of peripheral blood from patients with clinical suspicion of visceral leishmaniasis. Through the other culture was obtained 47 isolates of *Leishmania*, which were submitted to sequencing of the ITS region and RFLP-PCR with primers LINR4/LIN19 and enzymes *RsaI* and *HpaII*. *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* was the only species identified in 37 cases of visceral leishmaniasis. *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* was identified in two isolates from patients diagnosed with cutaneous leishmaniasis. Of the 100 samples examined 65 (65.0%) were positive for PCR, 62 (62.0%) for RT-PCR and 45 (45.0%) for the smear of bone marrow aspirate and 96 samples, 13 (13.54%) were positive for culture. The RT-PCR showed greater agreement with PCR (95.0%) followed by bone marrow smear (83.0%) and culture (53.1%). Genetic analysis of 47 *Leishmania* isolates gave 30 different genotypes and comparison of the ITS1 regions with the sequences deposited in Genbank was identified in most samples (44) *L. chagasi* the causative agent of visceral leishmaniasis and in cases of cutaneous leishmaniasis were identified *L. braziliensis* and *L. major*. The results confirmed the possibility of using three pairs of primers as a tool in the characterization of isolates of *Leishmania*, the RT-PCR in peripheral blood may be an alternative diagnostic visceral leishmaniasis from samples collected by a method less invasive and PCR / RFLP detected a high genetic variability in kDNA of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* human cases of Mato Grosso do Sul.

Key - words: *Leishmania*, PCR, phylogenetic, kinetoplast

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Histórico.....	12
2.2 Taxonomia.....	15
2.3 Ciclo biológico.....	16
2.4 Genoma do parasito.....	17
2.5 Leishmanioses.....	19
2.5.1 <u>Leishmaniose cutânea localizada</u>	19
2.5.2 <u>Leishmaniose cutânea difusa</u>	19
2.5.3 <u>Leishmaniose cutânea disseminada</u>	20
2.5.4 <u>Leishmaniose mucocutânea</u>	20
2.5.5 <u>Leishmaniose cutânea recidivante</u>	20
2.5.6 <u>Leishmaniose visceral ou Calazar</u>	20
2.5.7 <u>Leishmaniose dérmica pós-Calazar</u>	21
2.6 Diagnóstico.....	21
2.6.1 <u>Diagnóstico parasitológico</u>	22
2.6.2 <u>Diagnóstico imunológico</u>	23
2.6.3 <u>Diagnóstico molecular</u>	26
2.7 Caracterização e diversidade genética de <i>Leishmania</i>.....	31
3.0 OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Fase I.....	34
4.1.1 <u>Isolados</u>	34
4.1.2 <u>Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase-PCR</u>	34
4.2 Fase II.....	34

4.2.1 <u>Amostras</u>	35
4.3 Fase III	35
4.3.1 <u>Sequenciamento do fragmento de ITS-1</u>	36
4.3.2 <u>PCR-RFLP do DNA do cinetoplasto (kDNA) de <i>Leishmania</i></u>	36
4.3.3 <u>Construção da árvore fenética</u>	36
5.0 RESULTADOS	38
ARTIGO 1	39
ARTIGO 2	40
ARTIGO 3	50
6.0 DISCUSSÃO	65
7.0 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXO A	92

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um complexo de diferentes enfermidades ocasionadas por distintas espécies do gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida (ROSS 1903). Estas doenças de evolução crônica podem afetar a pele, mucosas e vísceras dependendo da espécie de *Leishmania* e da resposta imune do hospedeiro. São classificadas como antroponoses quando os insetos vetores participam na transmissão do parasito entre animais e o homem, nesse contexto, tem-se ocorrência na Europa, China e Américas. Se a transmissão ocorre através do vetor e sem a participação de animais a doença é conhecida como antroponose (Índia, África). As leishmanioses possuem em comum o vetor (inseto díptero hematófago), o reservatório (vertebrados) e o parasitismo das células do sistema fagocítico mononuclear (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007).

Agrupam-se no gênero *Leishmania* cerca de 30 espécies, sendo aceitas aproximadamente 21 com a capacidade de produzir alterações patológicas na espécie humana (ASHFORD, 2000; HERWALDT, 1999). No homem a doença manifesta-se em formas clássicas descritas como leishmaniose cutânea, leishmaniose cutâneo mucosa, leishmaniose cutânea disseminada, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose dérmica pós-calazar e a leishmaniose visceral (ASHFORD, 2000).

Estão presentes em todos os continentes com exceção da Antártida (WHO, 1990; DESJEUX, 1992). Estudos recentes apontam pela primeira vez para a existência de casos de leishmaniose cutânea em cangurus australianos (ROSE et al., 2004; DOUGALL et al., 2009). É descrita em 24 países da América e estende-se do sul dos Estados Unidos (Texas) até o norte da Argentina e Europa. Constituem graves problemas de saúde pública devido aos elevados custos de ordem psicológica, social cultural e econômica, além da mortalidade e morbidade elevadas (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007).

Atualmente 90% dos casos de leishmaniose visceral (LV) ocorrem em áreas rurais pobres e subúrbios de seis países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil, representando uma incidência anual de 500.000 casos com aproximadamente 59.000 mortes oficiais, sendo esse número de mortes só ultrapassado, entre as doenças parasitárias, pela malária.

Como a Índia, Nepal e Bangladesh são responsáveis por 67% dos casos anuais de LV no mundo, o governo dos três países tem um programa regional de eliminação de LV. Esse programa tem como meta a eliminação da LV como problema de saúde pública até 2015, com uma abordagem para diminuir a incidência anual para menos de 1 caso a cada 10.000 habitantes (CHAPPUIS et al., 2007).

No Brasil, a importância da leishmaniose visceral, reside não somente na sua elevada incidência e ampla distribuição, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais quando associadas a quadros de má nutrição e infecções concomitantes (COSTA; VIEIRA, 2001).

A ocorrência da doença em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor e de um hospedeiro/reservatório suscetível. A possibilidade de que o homem, principalmente crianças desnutridas, venha em alguns casos a ser fonte de infecção pode conduzir a um aumento na complexidade da transmissão da leishmaniose visceral (GENARO, 2000; BANETH, 2006).

A coinfeção *Leishmania* - HIV é outro aspecto epidemiológico que têm se tornado um sério problema de saúde pública, especificamente na Europa e América do Sul, onde a ocorrência de transmissão do vírus HIV em áreas endêmicas para leishmaniose visceral tem mudado as características epidemiológicas dessa parasitose. A presença do vírus HIV aumenta o risco de desenvolver a doença de forma fulminante entre 100 e 2320 vezes, e por sua vez a leishmaniose visceral promove a progressão clínica da infecção pelo HIV e o desenvolvimento da AIDS (ALVAR et al., 2008).

As leishmanioses apresentam um amplo espectro clínico devido à elevada diversidade de espécies, além da variabilidade genética (WOOLHOUSE et al., 2001), da mesma forma, o “background” genético do hospedeiro também tem um papel importante no processo de infecção, desenvolvimento e diversidade de fenótipos clínicos da doença (FRADE, 2011).

Em razão da carência de informações genéticas sobre as espécies de *Leishmania* que ocorrem no Mato Grosso do Sul, o *status quo* de área endêmica, a relevância da genética no padrão sintomatológico e a possível influência genotípica na resposta ao tratamento, o presente trabalho avaliou técnicas para identificação de espécies, técnicas de diagnóstico com amostras biológicas obtidas por meio menos invasivo e identificou a diversidade genética dos parasitos, a fim de obter

conhecimentos que possam contribuir com a rotina do diagnóstico e tratamento específico adequado para o bem estar dos pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

O gênero *Leishmania* possui origem controversa, alguns autores sugerem o surgimento no Neotrópico e outros no Paleoártico ou Neoártico (NOYES, 1998; KERR, 2000; LUKES et al., 2007). Contudo, a disseminação deste parasito seguiu a migração de vetores e hospedeiros (PERROTEY et al., 2005).

Provavelmente os hospedeiros definitivos de leishmânias primitivas devem ter sido répteis ou mamíferos. O primeiro registro fóssil de *Leishmania*, *Paleoleishmania proterus*, data do início do Cretáceo (100 milhões de anos). Esta descoberta também revelou a presença de larvas de insetos cohabitando com flagelados de vida livre semelhantes à tripanosomatídeos (POINAR; POINAR, 2004). Foi sugerido que esses flagelados eram provavelmente ingeridos e, posteriormente, se replicavam dentro dessas larvas (POINAR, 2007). Uma vez no inseto adulto, os flagelados poderiam ser transmitidos para um hospedeiro vertebrado, assim estabelecendo o ciclo do protozoário. Isto provavelmente aconteceu antes do surgimento de mamíferos placentários, no Paleoceno.

A chamada teoria monofilética para origem das leishmânias foi formulada por Thomas-Soccol et al. (1993) que, baseando-se em estudos de DNA mitocondrial de vinte espécies diferentes de leishmânias do mundo, consideraram que os troncos *Viannia* e *Leishmania* tiveram origem comum, remontando aos períodos cretáceo e jurássico, há 120 milhões de anos, quando os continentes estava unidos na Pangéia. Contudo, a questão sobre o local de origem das espécies de leishmânias continua controversa, entre as regiões neotropical (LAINSON; SHAW et al., 1998; NOYES, 1998), paleoártica (KERR, 2000) e africana (MOMEN; CUPOLILLO, 2000).

Desde a antiguidade, já há relatos de leishmaniose cutânea, havendo descrições das suas manifestações clínicas na biblioteca do Rei Ashurbanipal do 7º século a.C., com relatos da doença que datam de 1500 a 2500 anos a.C. (MANSON-BAHR, 1996).

Os médicos muçulmanos, incluindo Avicena, no século 10 d.C. deram uma descrição detalhada do que foi chamado de Balkh ferida (REY, 1992; GENARO 2004). Em 1756, Alexander Russell, depois de examinar um paciente turco, fez uma das descrições mais detalhada da clínica da doença.

Peter Borovsky, um cirurgião militar russo trabalhando em Tashkent, realizou pesquisas sobre a etiologia da ferida oriental, conhecida localmente como "Sart ferida, e em 1898 publicou a primeira descrição precisa do agente causador, descrevendo corretamente o parasito em tecidos infectados. Em função dos seus resultados terem sido publicados em russo, em um jornal com circulação baixa, sua prioridade não foi reconhecida internacionalmente durante sua vida (ALTAMIRO-ENCISO et al., 2003).

No Novo Mundo, a forma cutânea da doença foi encontrada no Equador e no Peru, em cerâmicas pré-inca (Figura 1) representando lesões de pele e rostos deformados que remontam ao primeiro século d.C. Em textos dos séculos 15 e 16 do período Inca, os colonos espanhóis a chamavam "doença do vale", "doença dos Andes" ou "lepra branca", tratando-se possivelmente da leishmaniose cutânea (ALTAMIRO-ENCISO et al., 2003).

A leishmaniose visceral ou calazar foi descoberta em 1835 por Roeser na ilha grega de Hydra, onde era conhecida pelo nome de "ponos ou hapoplinakon". Em 1869 na Índia, Clarke descreveu o que seria o "Kala jwar" que significa febre negra ou "Kala azar", assim chamada devido ao discreto aumento de pigmentação da pele observada nos pacientes (MARZOCHI et al., 1981).



Figura 1. (A) Estátua de um colono moche, Museu da América, Madrid. (B) Colono moche na região La Libertad-Peru. (C) Peça moche do museu etnográfico de Berlin.

Fonte: Página da Web da Organização Mundial da Saúde.

Em 1900, Willian Leishman identificou certos organismos em esfregaços de baço de um soldado que havia morrido de "febre Dum Dum" (Dum Dum é cidade próxima a Calcutá-Índia). O quadro clínico era caracterizado por debilidade generalizada, episódios intermitentes de febre, anemia severa e um exacerbado crescimento do baço.

Inicialmente o organismo associado a estas infecções foi considerado como sendo do gênero *Trypanosoma*, mas em 1903, ano em que foram publicadas as observações de Leishman, Donovan encontrou o mesmo protozoário e o descreveu como novo parasito. Laveran e Mesnil, em 1903, o consideraram como piroplasma, denominando-o *Piroplasma donovani*, nome corrigido por Ross no mesmo ano. Esse último foi quem descobriu a conexão entre o parasito e o "kala-azar", criando-se assim o gênero *Leishmania* (ROSS 1903). Em 1904, Leonard Rodgers foi o primeiro a conseguir cultivar estes protozoários e observou que nos cultivos os protozoários apresentavam-se sob a forma flagelada (FAUST et al., 1974). Quatro anos depois, Nicolle demonstrou a presença do mesmo parasito em crianças com anemia e esplenomegalia.

No ano de 1908, Comte e Nicolle observaram a presença do protozoário em cães na Tunísia, sugerindo o papel do cão como reservatório no ciclo biológico do parasito (NICOLLE, 1908).

O primeiro caso no Brasil foi descrito por Migone em 1913. O paciente era um imigrante italiano que vivera muitos anos em Santos-SP e após viajar para Mato Grosso (após 1979 foi denominado Mato Grosso do Sul), apresentou os primeiros sinais da doença, tendo sido diagnosticada a doença no Paraguai (ALENCAR, 1977), porém a sua passagem por diversas regiões não permitiu determinar onde o paciente adquiriu a infecção.

Após o ano de 1913 não houve registro da doença no Paraguai, até o aparecimento do primeiro caso autóctone em 1945 (BOGGINO; MAAS, 1945), constituindo atualmente uma doença em constante expansão naquele país. Foi Penna (1934), um patologista do Instituto Oswaldo Cruz, quem iniciou os estudos sobre a distribuição geográfica da leishmaniose visceral nas Américas, quando comprovou parasitologicamente, 41 casos dentre 40.000 viscerotomias examinadas para febre amarela provenientes de vários estados do Brasil.

No Estado de Mato Grosso do Sul (MS) os primeiros relatos da doença foram a partir de 1980 em Corumbá e Ladário (REGO et al., 1983). Na capital, Campo

Grande, o primeiro caso autóctone canino foi registrado em 1998 (SILVA et al., 2000), e os primeiros casos humanos em 2002 (FURLAN, 2010).

O processo de endemização da doença com elevada incidência em Campo Grande (BOTELHO; NATAL, 2009) e Três Lagoas (OLIVEIRA et al., 2006) confirmam sua expansão e urbanização. O Estado é o oitavo do país com o maior registro de casos e apresenta letalidade média de 8,6%, sendo que a doença já foi registrada em 56 dos 78 de seus municípios (MATO GROSSO DO SUL, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009b).

2.2 Taxonomia

O conceito biológico de espécie consiste em um agrupamento de populações naturais intercruzantes, reprodutivamente isoladas de outros grupos com as mesmas características (MAYR, 1970). Este conceito não pode ser aplicado em organismos unicelulares como *Leishmania*, uma vez que apresentam reprodução essencialmente assexuada (TIBAYRENC et al., 1990). Portanto, um conjunto de características (dados moleculares, geográficos, climáticos, evolução de vetores e hospedeiros) deve ser sempre considerado para se estudar a evolução desses organismos (KERR, 2006).

Este protozoário flagelado está classificado como protista com a seguinte taxonomia (LEVINE et al., 1980):

Reino: PROTISTA Haeckel, 1866

Subreino: PROTOZOA Goldfuss, 1817

Filo: SARCOMASTIGOPHORA Honigberg-Balamuth, 1963

Subfilo: MASTIGOPHORA Deising, 1866

Classe: ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909

Ordem: KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963; modificado por Vickerman, 1976

Subordem: TRYPANOSOMATINA Kent, 1880

Família: TRYPANOSOMATIDAE Doeflein, 1901

Gênero: *Leishmania* Ross, 1903

Subgênero: *Leishmania* Sařjanova, 1982

No gênero *Leishmania* se descrevem dois subgêneros em função do lugar de reprodução no trato digestivo do vetor (LAINSON et al., 1979; 1987): subgênero

Leishmania (SAF'JANOVA, 1982) com desenvolvimento suprapilárico dos flagelados e subgênero *Viannia* (LAINSON; SHAW, 1987) de multiplicação peripilórica.

2.3 Ciclo biológico

A transmissão ocorre para o homem e para os animais durante o repasto sanguíneo realizado por flebotomíneos fêmeas. A infecção inicia-se quando o inseto regurgita formas promastigotas do parasito em seu estágio metacíclico (SACKS, 1989; SCHLEIN, 1993), dentro das chamadas “piscinas de sangue” na derme dos hospedeiros vertebrados, formadas pela ação de sucção do inseto.

Após inoculação, as formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos da pele (Figura 2), onde se modificam para formas aflageladas e ovóides conhecidas como amastigotas. Nos mamíferos as formas amastigotas residem e multiplicam-se principalmente dentro dos endossomos das células constituintes do SMM - Sistema Monocítico Mononuclear (RUSSEL; TALAMAS-ROHANA, 1989, MOSSER; ROSENTHAL, 1993).

Dentro das células do SMM as formas amastigotas multiplicam-se por divisão binária até ocupar todo o citoplasma. Em alguns casos o núcleo dessas células chega a deslocar-se lateralmente para dar lugar ao vacúolo com as formas amastigotas (RUSSELL; TALAMAS-ROHANA, 1989). O processo ininterrupto de divisão das amastigotas determina o abarrotamento de parasitos dentro dos macrófagos, até que esses sejam lisados, com liberação das amastigotas que infectarão novas células. Ocorre uma fagocitose por parte dos macrófagos que englobam o parasito em um vacúolo parasitóforo para eliminá-lo mediante uma cascata de metabólitos derivados do oxigênio, como por exemplo, o óxido nítrico, e a liberação de hidrolases lisossomais. A *Leishmania* evade das reações inespecíficas do macrófago para sobreviver e multiplicar em seu interior. A progressão da enfermidade dependerá da resistência das amastigotas a essas reações, da virulência do protozoário e da eficiência da resposta imune do hospedeiro.

Podem ocorrer pequenas variações nesse processo de acordo com as diferentes espécies de *Leishmania*, as características genéticas dos hospedeiros e das interações imunológicas desencadeadas pelo parasitismo (CHANG, 1979; MOSSER; ROSENTHAL, 1993; MOSSER; BRITTINGHAM, 1997). Ao realizar o

repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, os insetos ingerem formas amastigotas de *Leishmania* presentes no sangue. No tubo digestório dos insetos, as formas amastigotas transformam-se em formas promastigotas que sofrem várias transformações, com migração para porções anteriores do trato digestório (formas metacíclicas infectantes). A fêmea ao fazer um novo repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, inocula as formas promastigotas fechando-se o ciclo (CHANG, 1979; SCHLEIN, 1993).

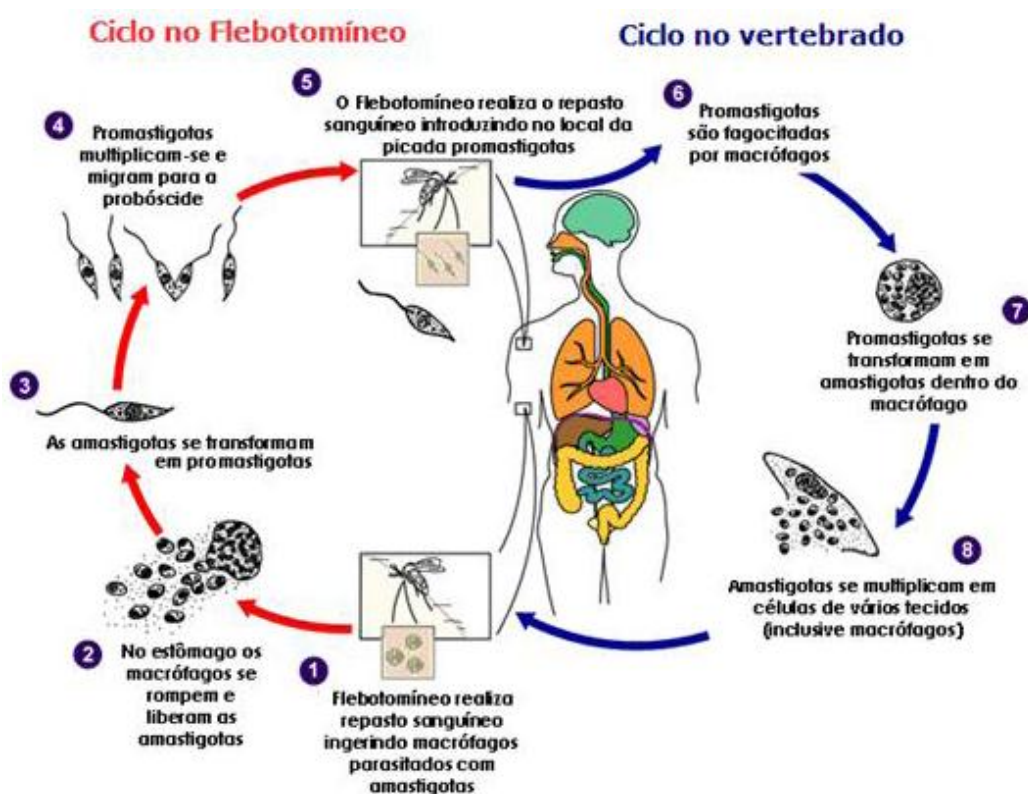


Figura 2 – Ciclo de vida de *Leishmania* (Adaptado de Centers for Diseases Control and Prevention).

Fonte: (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>).

2.4 Genoma do parasito

Os protozoários da ordem Kinetoplastida possuem seu DNA genômico localizado em três regiões: no núcleo (DNA cromossômico), na mitocôndria ou cinetoplasto (kDNA) e no citoplasma (DNA extracromossômico) (CHOCHOLOVÁ; JIRKU; LUKES, 2008). O kDNA é classificado em maxicírculos presentes entre 20 a 50 cópias por célula, e minicírculos com 10.000 cópias por célula (SIMPSON et al., 1980; SHAPIRO; ENGLUND, 1995) que se replicam independentemente.

Diferentemente do DNA cromossômico, rico em G/C (>60%), o kDNA é rico em conteúdo A/T (72-73%).

Os maxicírculos constituem um grupo composto por moléculas grandes, com cerca de 20-35kb extremamente homogêneas entre os diferentes grupos que compõe a ordem Kinetoplastida. Os minicírculos são moléculas menores (0,5-1,5kb), que apresentam-se em grande quantidade e com sequências heterogêneas entre os grupos. Dessa maneira, são amplamente utilizados para separar classes, gêneros ou espécies (BARKER, 2011; NOYES et al., 1998; FERNANDES et al., 1996). Cada minicírculo de *Leishmania* é composto de uma molécula de DNA circular com uma região conservada de aproximadamente 200pb contendo três blocos de sequências conservadas em todas as espécies de *Leishmania*. O restante da molécula, aproximadamente 550-700pb, apresenta sequências altamente variáveis, contendo um grande número de nucleotídeos A e T. Portanto, nessa região, pode-se encontrar sequências específicas para os diferentes grupos de *Leishmania*.

Outra região gênica amplamente utilizada como alvo para genotipar espécies de *Leishmania* é o gene RNA mini-exon (ou *spliced leader*–SL), localizado no núcleo de todos os grupos da ordem Kinetoplastida.

Cada genoma apresenta cerca 100 a 200 cópias e cada uma delas, denominada SL, é composta de uma região de transcrição conservada (*exon*) contendo uma sequência de 39pb e outra região (*intron*), também conservada, mas de tamanho variável (55 a 101pb, dependendo da espécie). Entre cada SL existem regiões variáveis que não são transcritas e diferem na sequência de nucleotídeos e no tamanho (140 a 350pb), dependendo do complexo *Leishmania*.

Em eucariotos, o DNAr (ribossômico) compreende uma família multigênica, organizada em unidades repetidas ou em *tandem* dentro da região organizadora nucleolar. Cada unidade consiste de regiões altamente conservadas que codificam os genes para os RNAs 18S, 5,8S e 28S, intercaladas por regiões variáveis de espaçadores não-codificantes. Na maioria dos animais, existem de 100 a 500 cópias do gene codificante do DNAr no genoma nuclear. Cada unidade de transcrição é composta de uma região promotora líder (ETS – *External Transcribed Spacer*), uma região codificadora do RNAr 18S, um espaçador não-codificante interno (ITS1), uma região codificadora de RNAr 5,8S, um outro espaçador não-codificante interno (ITS2), uma região codificadora de RNAr 28S. As regiões ITS possuem sequências com variações intra e interespecíficas. Sua utilização como marcador molecular é

possível graças a essas variações (MATEUS, 2006). Estima-se a presença de 20 a 200 cópias idênticas da região ITS1 no genoma da *Leishmania* (ODIWUOR, 2010).

As leishmânias apresentam de 20 a 36 cromossomos de aproximadamente 150 kilobases para os minicromossomos e quatro megabases para os de maior tamanho (VAN DER PLOEG et al., 1984).

2.5 Leishmanioses

Dentro do complexo das leishmanioses existe um espectro de manifestações clínicas como apresentada por Álvarez (2010):

- a) Leishmaniose cutânea localizada;
- b) Leishmaniose cutânea difusa;
- c) Leishmaniose cutânea disseminada;
- d) Leishmaniose mucocutânea;
- e) Leishmaniose cutânea recidivante;
- f) Leishmaniose visceral;
- g) Leishmaniose dérmica pós calazar;

2.5.1 Leishmaniose cutânea localizada

Apresenta-se com uma ou várias lesões localizadas em qualquer região da superfície corporal, com predomínio das áreas expostas. Inicia-se com eritema que pode evoluir a pápula e posteriormente a úlcera, com bordas bem definidas, elevadas, hiperemiadas e endurecidas, onde normalmente há elevada carga parasitária. Lesões em forma de placas, pápulas ou nódulos, predominam no Velho Mundo. Pode curar espontaneamente. É causada por diversas espécies do subgênero *Leishmania* e *Viannia*.

2.5.2 Leishmaniose cutânea difusa

Caracteriza-se como crônica e progressiva. Manifesta-se com lesões ulceradas dérmicas, pápulas, placas ou nódulos com grande número de amastigotas que podem persistir indefinidamente, representa o pólo anérgico da doença, sua

cura não é espontânea, além de ser muito resistente ao tratamento. É causada por parasitos do subgênero *Leishmania*, principalmente pelo complexo mexicana.

2.5.3 Leishmaniose cutânea disseminada

Apresenta lesões múltiplas, geralmente ulceradas ou eritematosas, distribuídas por todo o corpo, distantes do sítio de inoculação primária. É ocasionada pela *Leishmania braziliensis* ou *Leishmania amazonensis*.

2.5.4 Leishmaniose mucocutânea

É a manifestação clínica mais severa da forma cutânea. Ocorre disseminação hematogênica ou linfática do parasito, da pele até a mucosa oro-nasofaríngea. Os sintomas nasais crônicos podem preceder a destruição progressiva da cavidade bucal e nasofaríngea. Causada pelos parasitos do subgênero *Viannia* na maioria dos casos (*L. braziliensis* em maior proporção, *L. guyanensis* e *L. panamensis*). Não há cura espontânea, é de difícil tratamento e potencialmente fatal. Raros casos são reportados fora da América, geralmente relacionados com a espécie *L. aethiopica*.

2.5.5 Leishmaniose cutânea recidivante

Lesão papular na face, não ulceradas, que persiste por muitos anos. Caracteriza-se por repetição da lesão na borda de outra lesão curada. Causada por *Leishmania (Leishmania) tropica* no Irã, Iraque e áreas vizinhas.

2.5.6 Leishmaniose visceral ou calazar

A leishmaniose visceral (VL) ou calazar é uma doença sistêmica causada pela disseminação da *Leishmania* pelo sistema reticuloendotelial (GREVELINK; LERNER, 1996). O período de incubação varia de 10 dias a um ano (MALLA; MAHAJAN, 2006). É, muitas vezes, precedida por uma lesão seca ou ulcerada no local da picada do inseto (ASHFORD, 2000).

Os sinais sistêmicos como febre intermitente média-grave, anemia, esplenomegalia, hepatomegalia e caquexia progressiva desenvolvem-se em vários graus, entre semanas a anos após a infecção. Sinais menos frequentes incluem linfadenopatia e diarreia. Hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia (IgG e IgM) são características frequentes (AWASTHI et al., 2004). Se não tratada pode resultar em morte (ASHFORD, 2000).

É sem dúvida uma forma severa que ameaça a vida do paciente se não receber tratamento adequado. As espécies comumente relacionadas são *L. donovani* e *L. infantum* (sinonímia *chagasi*). Podem apresentar resistência ao tratamento de primeira linha e possuem forte relação com a pobreza e a desnutrição.

2.5.7 Leishmaniose dérmica pós-calazar

Presença de lesões dérmicas que inicialmente são proeminentes na face e aparecem depois da enfermidade visceral. A doença manifesta-se sob várias formas clínicas, desde máculas hipopigmentadas a nódulos infiltrados ou ulcerados, presentes em algumas regiões do corpo e repletos de parasitos (ZIMMERMANN et al., 2009). Aparece habitualmente no espaço de dois anos após cura completa (ASHFORD, 2000).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico das leishmanioses pode ser feito com base na clínica e dados epidemiológicos, mas deve ser confirmado pela demonstração do parasito para evitar erros no diagnóstico (MARFURT et al., 2003). A ampla diversidade de espécies e os diferentes níveis de virulência, em função da genética, são fatores que influenciam o tipo de resposta aos protocolos de tratamento, o que exige uma abordagem terapêutica específica. Por isso, tanto por razões clínicas quanto epidemiológicas é importante identificar as espécies de *Leishmania*. Os dados epidemiológicos fornecidos pela identificação de parasitos em uma determinada região são fundamentais para a concepção de adequada das medidas de controle (BAÑULS et al., 2007).

Os métodos de diagnóstico são classificados em métodos diretos e indiretos, dentre os diretos tem-se os exames parasitológicos e os moleculares cada vez mais utilizados devido à elevada sensibilidade e especificidade. Entre os indiretos estão disponíveis a RIFI - reação de imunofluorescência, ELISA – ensaio de imunoadsorção enzimática, “Western Blotting” ou “Immunoblotting”, aglutinação direta, teste rápido Anticorpo *Leishmania donovani* - TRALd e a intradermoreação de Montenegro.

2.6.1 Diagnóstico parasitológico

O exame parasitológico pode ser realizado a partir de biópsias aspirativas esplênicas, hepáticas, medulares e de linfonodos, das seguintes formas: exame direto dos aspirados, cultivos *in vitro* desses materiais biológicos e pela inoculação em animais de laboratório como os hamsters (*Mesocricetus* spp.), esperando-se o surgimento dos sinais clínicos para a detecção do parasito (BRASIL, 2006).

No exame direto, esfregaços ou “imprints” são preparados, fixados em lâmina por uma solução alcoólica e corados para posterior avaliação da presença de *Leishmania* sp. em macrófagos (BRASIL, 2006).

As amostras podem também ser inoculadas em meio de cultivo (meio monofásico ou meio bifásico - meio NNN – Novy, MacNeal e Nicolle, acrescido de ágar sangue e coberto com um meio líquido RPMI 1624 ou Schneider’s contendo entre 10 – 30% de soro fetal bovino (SFB) e cultivadas por 4 a 5 semanas a 22-28°C, até que as promastigotas de *Leishmania* spp. possam ser visualizadas por microscopia invertida ou ótica (BARROUIN-MELO et al. 2006a; BRASIL, 2006; SCHUSTER; SULLIVAN, 2002; SINGH; SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR; RAI, 2002). A especificidade deste teste é 100%, mas a sensibilidade é muito variável, dependendo da homogeneidade de distribuição dos parasitos no tecido e experiência técnica do profissional para o diagnóstico adequado das amastigotas (SUNDAR; RAI, 2002).

Apesar de serem 100% específicas, as culturas são pouco utilizadas hoje em dia como meio de diagnóstico, devido a desvantagens como a demora dos resultados, suscetibilidade à contaminação microbiológica, dependência da carga parasitária e, por vezes, dificuldade de execução devido à fraca adaptação do

isolado ao meio. No entanto, são usadas quando se pretende obter um número de parasitos suficiente para identificação isoenzimática, antígeno para o diagnóstico imunológico, modelos de infecções experimentais, assim como para o “screening” de fármacos ou identificação molecular (MAIA; CAMPINO, 2008).

Embora a inoculação em hamsters seja um exemplo de prova parasitológica, ela não possui valor diagnóstico por requerer um tempo consideravelmente longo para que haja o desenvolvimento da sintomatologia e a confirmação diagnóstica (BRASIL, 2006).

Assim, o exame parasitológico para diagnóstico da LV depende da punção de um órgão acometido pela infecção (baço, medula óssea, fígado e linfonodos) e na avaliação via cultivo (BARROUIN-MELO et al., 2006a; 2006b). As principais desvantagens desta técnica diagnóstica são: a coleta invasiva (tecido medular); tempo longo para avaliação diagnóstica; necessidade de meios de cultivo; contaminação devido à manipulação da amostra; e o teste só pode ser realizado em laboratórios especializados. Com o material aspirado, pode-se preparar o esfregaço em camada delgada, fixar e corar pelo método de Giemsa, ou por método equivalente, sendo recomendado pelo Ministério da Saúde a leitura de quatro lâminas para cada paciente e a pesquisa das formas em 200 campos (BRASIL, 2006).

2.6.2 Diagnóstico sorológico

A imunofluorescência indireta (IFI) ou teste com anticorpo imunofluorescente (“Immuno Fluorescent Antibody Test – IFAT”) utiliza-se de lâmina de vidro com poços sensibilizados com promastigotas ou amastigotas de *Leishmania* sp. que, posteriormente, serão expostas ao soro do paciente e a um anticorpo conjugado a um fluorocromo e contra-corada com azul de Evans. Esta lâmina será então examinada em microscópio de fluorescência. O resultado é a recíproca da maior diluição do soro do paciente onde a positividade ainda pode ser detectada (BRASIL, 2006).

Como exemplo tem-se o *kit* brasileiro de diagnóstico da leishmaniose, produzido por BioManguinhos (FIOCRUZ), que utiliza promastigotas e apresenta 90% de sensibilidade e 80% de especificidade quando o ponto de corte escolhido é

1:40 (FIOCRUZ, 2011). Na Índia, títulos reativos, a partir de 1: 20, são considerados significantes e títulos de 1:128 são considerados diagnóstico de leishmaniose. O uso da forma amastigota aumenta a sensibilidade para 96% e mantém a especificidade em torno de 98%, tendo sido capaz de excluir reatividade cruzada com antígenos de outros tripanossomatídeos em avaliações feitas na Índia (SINGH; SIVAKUMAR, 2003).

As desvantagens deste teste são o pequeno número de exames por lâmina (10 – 12 amostras por lâmina menos os poços para os controles positivo e negativo); a reatividade cruzada; a ocorrência de falsos positivos e falsos negativos; o protocolo é trabalhoso e dificilmente feito a campo (ALVES; BEVILACQUA, 2004; GONTIJO; MELO, 2004; LEONTIDES et al., 2002; SINGH; SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR; RAI, 2002).

O ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA – “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”), ensaio imunoenzimático (EIE) ou imunoensaioenzimático (EIA – “Enzyme ImmunoAssay”), faz uso de microplacas de poliestireno de 96 poços, preenchidas ou sensibilizadas com antígenos (SRIVASTAVA et al., 2011). Atualmente quantidades diferentes, menores do que 5 µg, sejam relatadas em vários trabalhos, principalmente com antígenos purificados ou recombinantes (BRAZ et al., 2002; METTLER et al., 2005; ZERPA et al., 2002; ZIJLSTRA et al., 2001).

A reatividade cruzada de diversos antígenos utilizados neste teste, compostos de extratos “brutos” ou “crus”, como o SLA (Antígeno solúvel de *Leishmania* ou “Soluble-*Leishmania* Antigen”), embora sejam amplamente utilizados para sensibilização das placas, têm sido demonstrados contra outras espécies de *Leishmania* e com organismos filogeneticamente relacionados como o *Trypanosoma cruzi* (ALVES; BEVILACQUA, 2004; GONTIJO; MELO, 2004; METTLER et al., 2005; SUNDAR; RAI, 2002).

Métodos indiretos como os sorológicos, baseiam-se na detecção de anticorpos contra o agente, sendo recomendados para realização de inquéritos epidemiológicos (COSTA; VIEIRA, 2001; Mato Grosso do Sul, 2006), mas podem apresentar reações cruzadas com outras patologias como doença de Chagas (PRATA; SILVA, 2005). Além disso, existe uma significativa proporção de pessoas saudáveis que vivem em áreas endêmicas que podem ser soropositivas. Portanto, estes testes devem sempre ser usados em associação com o caso clínico para definir o diagnóstico de leishmaniose visceral (CHAPUIS et al., 2007).

Resultados negativos não excluem o diagnóstico de leishmaniose, principalmente na forma tegumentar (PAHO, 2003a), que tende a apresentar baixos títulos nos casos positivos, desaparecendo após o tratamento, sendo mais utilizados como controle da cura (MARZOCHI et al., 1980).

A leishmaniose visceral é caracterizada por hepato e esplenomegalia, hipergamaglobulinemia e presença de antígenos circulantes. Atualmente existem vários métodos disponíveis para o seu diagnóstico, porém os métodos sorológicos podem apresentar resultados conflitantes devido à presença de imunocomplexos presentes na amostra (CARVALHO, 2010).

O “*Western Blotting*” ou “*Immunoblotting*” fornece informações detalhadas sobre as respostas dos anticorpos a vários antígenos de *Leishmania* sp. Este teste é mais sensível que IFI e ELISA, embora seja caro, demorado e laborioso, portanto, é pouco utilizado no diagnóstico (SRIVASTAVA et al., 2011).

A maior sensibilidade e especificidade do “*Western blotting*” ou “*Immunoblotting*” está relacionada ao fato de que os diferentes anticorpos produzidos em resposta a infecção podem reconhecer as diferentes frações do complexo antigênico, separado eletroforicamente, permitindo o reconhecimento de forma específica e individual, gerando perfis de reconhecimento distintos, capazes de confirmar e diferenciar a infecção por *Leishmania* de outros parasitos, além do monitoramento, do prognóstico do paciente e da detecção de reações cruzadas (SUNDAR; RAI, 2002, SINGH; SIVAKUMAR, 2003).

Dentre as desvantagens desta técnica diagnóstica estão a dificuldade de execução (pessoal treinado e equipamentos específicos), produção do antígeno utilizado e, assim como em outras técnicas sorológicas, a ausência de resposta (imunossupressão), pode denotar falsos negativos (SINGH; SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR; RAI, 2002).

A intradermorreação de Montenegro, hipersensibilidade tardia do tipo IV ou DTH (“*Type IV Delayed-Type Hypersensitivity*”), detecta a resposta imune celular adquirida que se desenvolve pela ativação dos linfócitos T CD4+ sensibilizados, muito embora células TCD8+ também já tenham sido associadas.

É utilizada para diagnosticar leishmaniose cutânea e mucocutânea, podendo ser negativa nas quatro primeiras semanas da infecção, mas pode persistir positiva após o tratamento ou a cura espontânea da lesão. Em áreas endêmicas pode ser interpretada como contato com o parasito sem o desenvolvimento da doença

(infecção), alergia ao diluente ou reação cruzada com outras doenças, como doença de Chagas, tuberculose glandular, esporotricose e hanseníase (SINGH; SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR; RAI, 2002).

A ausência de antígeno padronizado, falta de estudos para validação do seu uso no diagnóstico e de valores de sensibilidade, especificidade, assim como, os valores preditivos positivos e negativos constituem desvantagens dessa técnica (BRASIL, 2006; SINGH; SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR; RAI, 2002).

A detecção de *Leishmania* por imunohistoquímica em tecidos previamente fixados em formalina e embebidos em parafina, também tem sido descrita e apresenta bons resultados, com fácil identificação de amastigotas no interior de macrófagos de diversos órgãos, alta sensibilidade e especificidade, principalmente em locais com baixo parasitismo (LIVNI et al., 1983; TAFURI et al., 2004).

Outras técnicas sorológicas como teste de Aglutinação Direta (“DAT”), teste Rápido de Detecção da Aglutinação (“FAST”), aglutinação em látex, imunodifusão em gel e o teste imunocromatográfico (ICT) baseado no antígeno rK39 também são utilizados em menor escala do que os exames sorológicos supracitados (PAHO, 2003b).

2.6.3 Diagnóstico molecular

As técnicas baseadas na PCR – reação em cadeia da polimerase, ou que manipulam o DNA, têm demonstrado resultados promissores no diagnóstico das leishmanioses, baseando-se na análise de moléculas de DNA do cinetoplasto (kDNA) ou do DNA nuclear (nDNA) (SHAW et al., 2005).

Para a genotipagem são utilizadas diferentes técnicas e alvos de amplificação, como RAPD (“Random amplified polymorphic”), kDNA e RFLP (“Restriction fragment length polymorphism”), Microssatélites, SSUrDNA (RNA ribossômico), “Spliced leader gene”(mini-exon), ITS (espaçadores internos transcritos), genes específicos (como gp63) e cromossomos (CRUZ; TOSI, 1996; ULIANA et al., 2000; VOLPINI et al., 2001; CASTILHO et al., 2008). São mais sensíveis que o exame microscópico, podendo ser aplicadas diretamente nas amostras de tecidos e mais rápidas que o isolamento, tendo a desvantagem de

necessitarem de laboratórios bem equipados, reagentes de alto custo e de uma técnica precisa (SHAW et al., 2005; CHAPUIS et al., 2007).

A PCR é mais sensível do que os métodos convencionais para a detecção dos parasitos no sangue ou órgãos, porém está restrita aos hospitais de referência e centros de pesquisas, não sendo usualmente empregada na rotina (CHAPUIS et al., 2007; DOURADO et al., 2007; FRAGA et al., 2010; SUNDAR; RAI, 2002; VAN DER MEIDE et al., 2008).

Esses métodos permitem também a quantificação dos parasitos e podem ser aplicados em estudos de avaliação do tratamento, estudos epidemiológicos, elaboração de vacinas (VAN DER MEIDE et al., 2008) ou ainda, para rápida identificação específica do parasito (ANTINORI et al., 2007).

Embora haja discordância entre alguns estudos quanto à sensibilidade da PCR no sangue periférico e na medula óssea, a detecção de *Leishmania* no sangue periférico tem sido, pelo menos, equivalente à pesquisa na amostra medular de indivíduos imunocompetentes ou imunossuprimidos (ANTINORI et al., 2007) e de crianças (FRAGA et al., 2010).

Por outro lado, um estudo realizado com crianças para a detecção de *L. infantum* baseado na sequência de kDNA, concluiu que as amostras de sangue periférico somente foram positivas quando o título de anticorpos anti-*Leishmania* era alto (superior a 5000). Desse modo, sugeriu-se o material medular como sendo o ideal para o diagnóstico pela PCR durante o período de infecção (FAYZI et al., 2008).

Existem ainda fatores que podem dificultar a padronização da PCR como a seleção dos genes e posteriormente iniciadores (*primers*), fato que influencia diretamente na sensibilidade e especificidade. Além disso, reações falso negativas podem ocorrer quando a quantidade de DNA está abaixo da sensibilidade de detecção do teste (MANSUR, 2009).

A utilização das diversas variantes da técnica de PCR (PCR-RFLP; PCR-SSCP; NESTED-PCR; Multiplex-PCR, *Real Time* - PCR, entre outras) na avaliação da diversidade genética, torna-se fundamental em taxonomia, diagnóstico, avaliação epidemiológica, genotipagem e genética de populações dos agentes causadores das leishmanioses, assim como de outras doenças, e vem sendo amplamente difundida, com resultados que apresentam alta sensibilidade e especificidade, além de excelente reprodutibilidade e eficácia (CORTES et al., 2004; EL TAI et al., 2001;

FERROGLIO et al., 2005; HARRIS et al., 1998; KUHLS et al., 2005; ROTUREAU et al., 2006; ZAIDI; KONSTANTINOU; ZERVOS, 2003).

A PCR em tempo real é uma técnica capaz de detectar a presença do parasito e quantificar a carga parasitária com elevada sensibilidade, tanto em humanos como em cães. É altamente sensível, já está sendo desenvolvida para o acompanhamento de diversas doenças, o que a torna uma ferramenta importante quando se avalia o tratamento (CAVALCANTI et al., 2010). O sistema é baseado no uso de corantes ou sondas fluorescentes que permitem o monitoramento em tempo real do produto amplificado. Um corante utilizado é o SYBR Green I, que se liga inespecificamente a fitas duplas de DNA geradas durante a amplificação. Trata-se de uma assimétrica cianina que, livre em solução não emite fluorescência, mas, ligada a moléculas de DNA emite um forte sinal luminoso (NYGREN; SVANVIK; KUBISTA, 1998). A toxidez do brometo tem levado ao maior uso desse corante (ZIPPER et al., 2004).

A fluorescência também pode ser produzida com o uso de uma sonda dirigida especificamente a uma região interna da sequência que se deseja amplificar. Um exemplo deste sistema é a chamada sonda *TaqMan*. À medida que vai ocorrendo a amplificação, a *Taq* polimerase, pela sua atividade exonuclease, desloca a extremidade 5' da sonda *TaqMan* (contendo o fluorocromo *reporter*) e cliva a sonda. Pelo fato do *reporter* ser liberado e não permanecer próximo ao *quencher* há liberação de fluorescência (MORTARINO et al., 2004; YANG; ROTHMAN, 2004). A análise da emissão de luz é feita por um detector de sinal luminoso e um amplificador de sinal que traçam um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo da PCR, a intensidade do sinal gerado reflete a quantidade do produto formado (KUBISTA et al., 2006). O ciclo onde o sinal de amplificação exponencial atinge uma intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção é denominado Ct (*Cycle threshold*) e o momento em que o Ct é ultrapassado está diretamente relacionado à quantidade de DNA amplificado (MORTARINO et al., 2004).

A análise dos resultados de um ensaio de PCR - RT é feita por meio dos gráficos gerados no computador interligado ao termociclador. Basicamente, são efetuadas quatro análises: curva de amplificação, curva de dissociação, espectro e componente.

Com a curva de amplificação pode-se verificar o Ct de cada amostra analisada, o que será de fundamental importância para o cálculo da especificidade

(σ) e determinação das amostras positivas. Segundo Too (2003), valores de C_t superiores a 35 indicam resultados falso positivos.

Por meio da curva de dissociação evidencia-se a emissão de fluorescência pela temperatura de fusão ou *melting temperature* (T_m). A T_m é a temperatura onde 50% dos produtos amplificados encontram-se dissociados na forma de fita simples, causando uma queda brusca da intensidade de fluorescência pela liberação do corante SYBR Green (BROWN, 2003). Nesta análise podem ser verificadas amplificações inespecíficas e dímeros de *primers*.

A avaliação do espectro mostra a captação da fluorescência por filtros ou seja, cada corante ou fluorocromo usado emite luz que será absorvida por um determinado filtro.

O componente mostra o comportamento da emissão de fluorescência de cada corante ou fluorocromo usado durante a reação. Desta forma, a referência passiva deve se manter constante e o corante usado, superá-la à medida que os ciclos da PCR vão sendo executados. É importante salientar que, caso seja utilizada sonda *TaqMan*, três parâmetros são evidenciados: a referência passiva, o fluoróforo (*reporter*) e o inibidor ou receptor de sinal luminoso (*quencher*).

A curva padrão também fornece o coeficiente angular da reta (*slope*) composta pelos pontos da curva. Este dado será importante para o cálculo da eficiência da amplificação (ϵ). Uma alta eficiência está associada a uma inclinação de, aproximadamente, 3,32 para cada diluição de 10 vezes do alvo (TOO, 2003). *Slope* de -3,3 relaciona-se a uma eficiência de 100% indicando que o número de moléculas amplificadas dobra a cada ciclo da PCR (KUBISTA et al., 2006).

Uma das vantagens da PCR em tempo real é possibilitar a eliminação da etapa laboriosa pós-amplificação (preparo do gel para eletroforese), convencionalmente necessária para visualização do produto amplificado. Desta forma, pode-se observar que as vantagens da qPCR em relação à PCR convencional são maiores e incluem, rapidez na obtenção dos resultados, reprodutibilidade e capacidade quantitativa (SUNDSFJORD et al., 2004; YANG; ROTHMAN, 2004).

A qPCR é uma técnica inovadora capaz de promover a quantificação acurada do *input* de DNA e o monitoramento, em tempo real, do produto amplificado. O sistema de quantificação possui aplicações variadas, incluindo identificação de alelos em DNA genômico, análise de sequências virais, bacterianas ou de

protozoários a partir de várias fontes, análise de patógenos em alimentos, análise de produtos transgênicos, além da aplicação em diagnóstico (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004). Muitos alvos podem ser monitorados simultaneamente usando fluorocromos com diferentes espectros de emissão (RAOULT; FOURNIER; DRANCOURT, 2004).

Com relação à LV, a técnica vem sendo utilizada em cães e em pacientes humanos, possibilitando a realização de estudos relacionados à carga parasitária, interação hospedeiro-parasito e monitoramento da terapia (FRANCINO et al., 2006; MARY et al., 2004; MORTARINO et al., 2004; NICOLAS et al., 2002; ROLÃO et al., 2004; VITALE et al., 2004; WORTMANN et al., 2004).

Mary et al. (2004) demonstraram uma boa correlação entre a quantificação de *L. infantum* em amostras de sangue e o *status* clínico dos pacientes, permitindo discriminar entre pacientes sintomáticos, pacientes curados e portadores assintomáticos, promovendo o diagnóstico e monitoramento da terapia com segurança e rapidez.

Atualmente, existem conjuntos diagnósticos disponíveis para a detecção e quantificação de DNA e RNA em amostras clínicas, especialmente desenvolvidos para o acompanhamento de pacientes com AIDS e hepatite C (RAOULT; FOURNIER; DRANCOURT, 2004). Diante do exposto, como para alguns autores, a PCR tem sido previamente definida como “padrão-ouro”, a quantitativa PCR em tempo-real certamente será a técnica de referência no futuro (MARY et al., 2004).

A técnica de PCR em tempo real também foi utilizada na detecção e quantificação de *Leishmania* sp. em tecidos de camundongo (NICOLAS et al., 2002) e na quantificação de citocinas em hamster infectados (IÑIGUEZ et al., 2006). Também foi empregada no diagnóstico da infecção humana em diferentes materiais como sangue (MARY et al., 2004) e lesões de pele (WORTMANN et al., 2004), nesses estudos a qPCR mostrou ser mais sensível que o exame direto ou cultura do mesmo material. Como não apresenta os vários passos de manipulação necessários após a amplificação pela PCR convencional, reduz os riscos de contaminação do material e permite, de forma simultânea, a detecção, medida e comparação do número de parasitos em diferentes amostras (VITALE et al., 2004; NICOLAS et al., 2002).

A PCR em tempo real também se mostrou mais sensível que a técnica de PCR convencional no diagnóstico e monitoração da infecção canina. Francino et. al.

(2006) verificaram que enquanto a PCR convencional foi negativa para amostras que apresentaram menos que 30 parasitos por mililitro de sangue periférico ou medula óssea, a PCR em tempo real apresentou sensibilidade de 0,001 parasitos, semelhante aos resultados de Mary et al. (2004) em humanos. Esta sensibilidade elevada é de particular importância no acompanhamento da infecção canina, uma vez que, uma importante característica da doença no cão é a presença de parasitos residuais ou latentes após o tratamento. A abordagem quantitativa é importante não somente para elucidar o “status” de positividade de cães em áreas endêmicas, mas também para monitorar o número de parasitos no pós-tratamento ou em triagens de quimioterápicos (FRANCINO et al., 2006).

2.7 Caracterização e diversidade genética de *Leishmania*

As técnicas de caracterização visam fornecer informações tanto para identificação das espécies, quanto para verificar diversidade genética intra e interespecífica. Pouco se conhece a respeito da variação genética das diferentes espécies deste parasito. Por esta razão, vários estudos vêm sendo realizados empregando diferentes métodos moleculares para um melhor entendimento sobre a circulação de determinadas populações de *Leishmania* entre hospedeiros e vetores em uma área geográfica, fator considerado de grande importância nas investigações epidemiológicas, principalmente quando há suposições de que os diferentes fenótipos destes parasitos possam estar associados às diferentes manifestações clínicas (TIBAYRENC,1999).

O método *standard* de identificação e diferenciação de espécies e subespécies em *Leishmania*, universalmente aceito, é a eletroforese enzimática *multilocus* ou tipagem isoenzimática, efetuada em Centros de Referência da Organização Mundial da Saúde. Este tipo de classificação tem por base a mobilidade eletroforética de isoenzimas, requerendo a análise de 8-15 enzimas diferentes que, depois de separadas em um gel de acetato de celulose, de acordo com a sua carga iônica, formam um padrão específico. Este padrão é definido como o arranjo único de bandas produzidas pelas diferentes isoenzimas. O conjunto das bandas (uma por enzima) produzidas por um determinado isolado origina o seu perfil isoenzimático, onde os grupos de isolados com o mesmo perfil isoenzimático se

designam por zimodemas (RIOUX et al., 1990). Entretanto, alguns autores consideram que essa metodologia, algumas vezes, não é suficientemente discriminatória (BOTILDE et al., 2006).

A genotipagem pode estar baseada no DNA de cinetoplasto (kDNA) ou DNA nuclear (nDNA) usando diferentes técnicas que variam desde análises como RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) de diferentes genes, como espaçadores internos transcritos (ITS) do gene de rRNA, betatubulina, gene gp63 e ainda os microssatélites.

Recentemente Alonso et al., (2010) utilizaram a técnica do PCR/RFLP na detecção de heterogeneidade no kDNA de isolados de *Leishmania* obtidos de casos humanos e cães. Os parasitos cultivados demonstraram elevado grau de homogeneidade e os resultados mostraram que a heterogeneidade de minicírculos do kDNA depende principalmente da origem das amostras. Outro estudo de heterogeneidade de kDNA com amostras de *Leishmania* de Israel e Palestina provenientes de 22 cães e 2 pacientes encontrou pouca variabilidade (NASEREDDIN et al., 2009).

Cortes et al. (2006) amplificaram uma parte variável do minicírculo de kDNA de *L. infantum* e submeteram as amostras à digestão com diferentes endonucleases de restrição. Observaram um perfil polimórfico quando foram utilizadas, entre outras, as enzimas *BglII*, *Vspl*, *RsaI*, *HpaII* e *DdeI*.

O primeiro relato de diversidade genotípica, utilizando o perfil de restrição do kDNA ocorreu entre isolados de *Leishmania* procedentes do Velho e Novo Mundo publicado em 1986. Neste trabalho, Pacheco et al. (1986) reportam o estudo genotípico de diferentes isolados de *L. chagasi* provenientes dos Estados da Bahia e do Rio de Janeiro. Apesar de terem sido analisadas somente uma amostra referência de *L. infantum* da França e outra de *L. donovani* da Índia, a distinção genética entre elas é bem nítida, da mesma forma que entre o perfil genético de *L. infantum* e diferentes isolados de *L. chagasi*. Além disso, a diversidade intraespecífica foi também observada, sendo os isolados da Bahia genotipicamente distintos daqueles encontrados para as amostras do Rio de Janeiro.

A análise dos polimorfismos nos fragmentos de restrição do kDNA é considerada um poderoso instrumento para estudos epidemiológicos e para mostrar variabilidade genética em amostras de *Leishmania* (BARKER; ARNOT, 1981; ANGELICI et al., 1989; PACHECO et al., 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar as espécies de *Leishmania* em isolados obtidos de casos humanos, avaliar o diagnóstico molecular e a diversidade genética dos isolados de *Leishmania* circulantes em Mato Grosso do Sul.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a efetividade dos *primers* RV1/RV2, a1/a2 e b1/b2 por meio da PCR para a identificação de espécies de *Leishmania* em isolados humanos;
- Comparar a eficiência diagnóstica entre a PCR em tempo real em sangue periférico e a PCR e exames parasitológicos convencionais;
- Identificar as espécies de *Leishmania* por meio do sequenciamento da região ITS1 e detectar diversidade genética utilizando a técnica de PCR/RFLP em kDNA de isolados de *Leishmania*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fase I: Identificação molecular de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul

4.1.1 Isolados

Foram analisados 39 isolados de *Leishmania* sp criopreservados no Laboratório de Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), obtidos no período de janeiro de 2007 a janeiro de 2008, à exceção de uma amostra do ano de 2003.

Amostras de aspirado medular ou de tecido da borda da lesão foram coletadas de pacientes com leishmaniose visceral e tegumentar, provenientes de diferentes instituições de saúde de Mato Grosso do Sul, e encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia para diagnóstico, caracterizando-se, portanto, como amostras de conveniência. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Anexo A).

4.1.2 Extração do DNA e Reação em cadeia da polimerase – PCR

A metodologia utilizada para identificação das espécies se encontra no trabalho intitulado: “**Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase**” publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 42 (3):303-308, mai-jun, 2009.

4.2 Fase II: Avaliação da PCR em tempo real em sangue periférico, para diagnóstico de leishmaniose visceral

4.2.1 Amostras

Foram utilizadas 100 amostras de sangue periférico de pacientes com sinais clínicos de leishmaniose visceral, coletadas em tubos a vácuo com EDTA no volume de 4 mL. Aspirado de medula óssea desses pacientes foi também coletado para o diagnóstico de rotina por meio de técnicas parasitológicas convencionais.

Considerando que na maioria das vezes o tratamento da LV é iniciado a partir do resultado do esfregaço de aspirado medular, este foi considerado o padrão ouro para a comparação com os outros testes, por ser o exame de rotina em Mato Grosso do Sul. Sua metodologia encontra-se especificada no trabalho submetido à revista *The Journal of Venomous Animals and Toxins Tropical Diseases* (JVAT).

4.3 Fase III: Diversidade genética de kDNA de *Leishmania*

4.3.1 Sequenciamento da região ITS1

Foi realizado o sequenciamento da região ITS1 ("internal transcribed spacer 1") de 47 isolados criopreservados de *Leishmania*, do Laboratório de Parasitologia/CCBS/UFMS.

Para o gênero *Leishmania*, a região de ITS1 (Figura 3) tem sido amplamente estudada, e se mostra com um número adequado de polimorfismos para a diferenciação, pelo menos, ao nível de espécie. Para a amplificação por PCR foram utilizados os pares de oligonucleotídeos LITSR e L5.8S segundo Schonian et al. (2003), sendo o produto da amplificação estimado entre 300 a 350pb.

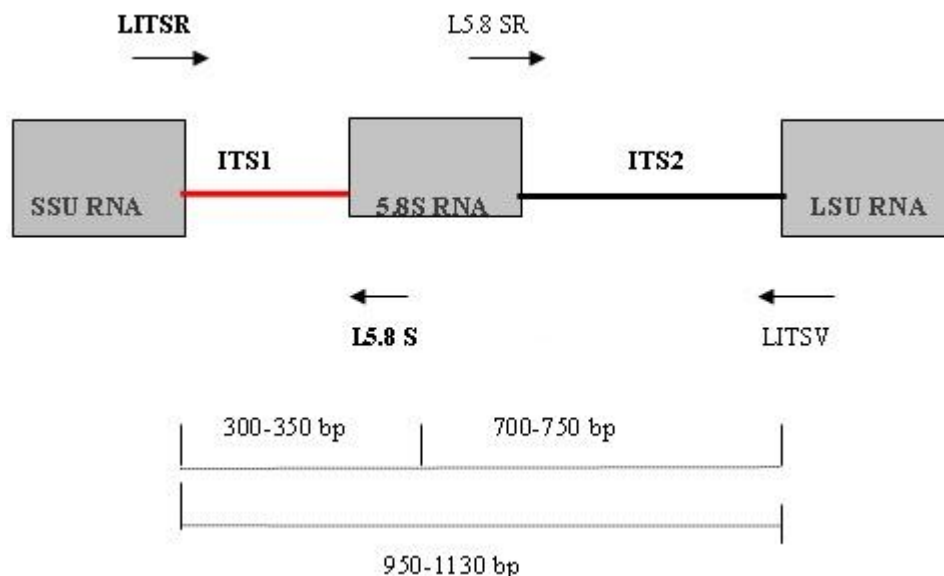


Figura 3 – Representação da região ITS1 e região de anelamento dos Iniciadores LITSR e L5.8S.

4.3.2 PCR/RFLP do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania*

Para as análises do DNA do cinetoplasto foram utilizados 47 isolados humanos de *Leishmania* do Estado de Mato Grosso do Sul, criopreservados no Laboratório de Parasitologia (CCBS/UFMS).

As reações de PCR para a amplificação foram realizadas com os oligonucleotídeos LINR4 e LIN19 (ARANSAY et al., 2000), gerando um fragmento amplificado de 720 pb que representa quase a totalidade do minicírculo.

4.3.3 Construção da árvore fenética

Os fragmentos gerados na digestão foram utilizados na construção de uma matriz binária (1 indica a presença de um fragmento e 0 a ausência), que foi convertida numa matriz de distância com o uso do programa RESTDIST, que por sua vez, foi utilizada na construção de um dendograma pelo método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) com a utilização do programa NEIGHBOR (ambos os programas fazem parte do pacote de programas PHYLIP, versão 3.6, disponível em:

<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). A árvore fenética resultante foi construída com o programa TREEVIEW versão 1.6.

A metodologia utilizada para a detecção de variabilidade genética de kDNA de *Leishmania* encontra-se descrita no artigo: “**Diversidade genética de kDNA de *Leishmania* no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil**” a ser submetido para publicação.

5.0 RESULTADOS

ARTIGO 1

Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul, por meio da reação em cadeia da polimerase

Publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,
42(3):303-308, mai-jun,2009.

Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase

Identification of *Leishmania* species isolated in human cases in Mato Grosso do Sul, by means of the polymerase chain reaction

Manoel Sebastião da Costa Lima Junior¹, Renato Andreotti², Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval³, Elisa Teruya Oshiro³, Alessandra Gutierrez de Oliveira³ e Maria de Fatima Cepa Matos⁴

RESUMO

As leishmanioses são zoonoses endêmicas em Mato Grosso do Sul e têm por agentes etiológicos nessa região *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Como método para identificação de espécies de *Leishmania*, a reação em cadeia da polimerase é uma ferramenta com elevada especificidade e sensibilidade. Analisaram-se 39 isolados de *Leishmania* criopreservados, obtidos por meio de aspirado medular e/ou biópsia de lesão, conforme a suspeita clínica. Os isolados foram submetidos à extração de DNA e à reação em cadeia da polimerase com os iniciadores: RV1/RV2 para *Leishmania (Leishmania) chagasi*, a1/a2 para a identificação de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e b1/b2 para *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Leishmania (Leishmania) chagasi* foi a única espécie identificada em 37 casos de leishmaniose visceral. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foi identificada em dois isolados de pacientes com diagnóstico de leishmaniose tegumentar. Os resultados obtidos confirmam a possibilidade do uso dos três pares de iniciadores como uma ferramenta na caracterização de isolados de *Leishmania*.

Palavras-chaves: *Leishmania*. Leishmaniose visceral. Leishmaniose tegumentar. Reação em cadeia da polimerase. Mato Grosso do Sul.

ABSTRACT

Leishmaniasis are endemic zoonoses in the State of Mato Grosso do Sul. Their etiological agents in this region of Brazil are *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. The polymerase chain reaction (PCR) is a tool with high specificity and sensitivity for identifying *Leishmania* species. This study examined 39 cryopreserved isolates of *Leishmania* that had been collected by bone marrow aspiration and/or lesion biopsy, depending on the clinical suspicion. The isolates were subjected to DNA extraction and PCR using the following primers: RV1/RV2 for identifying *Leishmania (Leishmania) chagasi*, a1/a2 for *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and b1/b2 for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Leishmania (Leishmania) chagasi* was the only species identified in the 37 cases of visceral leishmaniasis. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* was identified in two isolates from patients with a diagnosis of cutaneous leishmaniasis. The results obtained confirm that it is possible to use these three pairs of primers as a tool for characterizing *Leishmania* isolates.

Key-words: *Leishmania*. Visceral leishmaniasis. Cutaneous leishmaniasis. Polymerase chain reaction. Mato Grosso do Sul.

1. Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 2. Embrapa Gado de Corte, Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 3. Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 4. Departamento de Farmácia-Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

Apoio financeiro: Fundect/MS.

Endereço para correspondência: Dra. Maria de Fátima Cepa Matos. Dept^o de Farmácia-Bioquímica/CCBS/UFMS. Caixa Postal 549, 79070-900 Campo Grande, MS. Tel: 55 67 3345-7358 e-mail: mfcmatos@nin.ufms.br

Recebido para publicação em 17/12/2008

Aceito em 03/04/2009

As leishmanioses são zoonoses que se apresentam sob diferentes formas clínicas, a leishmaniose tegumentar cutânea, mucocutânea e cutânea difusa, e a leishmaniose visceral^{27,28}.

A identificação das espécies de *Leishmania* que circulam em determinado foco de transmissão, particularmente em regiões onde as diferentes formas clínicas ocorrem simultaneamente, é muito importante para o conhecimento da epidemiologia das leishmanioses e planejamento de estratégias de controle².

Tratando-se de leishmaniose visceral nas Américas, a única espécie considerada responsável pela doença é *Leishmania (Leishmania) chagasi*, embora já se tenha descrito *Leishmania (Leishmania) amazonensis*⁵ e *Leishmania (Viannia) braziliensis*⁴⁸ como

agentes de leishmaniose visceral, destacando-se, portanto, a importância da identificação do agente causal por métodos específicos e não por correlação sintomatológica à espécie usualmente conhecida.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica altamente sensível e específica, e pode detectar o DNA ou RNA do parasita⁴⁹⁻⁵², em diagnóstico humano⁴⁷, canino²⁰⁻⁴⁴ e em flebotomíneos²⁴⁻³⁵⁻³⁶, sendo também útil na caracterização de isolados humanos³⁷.

O DNA de cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* tem sido utilizado como uma ferramenta de diagnóstico pela PCR, devido a capacidade de detectar pequenas quantidades de DNA do parasito em materiais biológicos, o que se deve à abundância de minicírculos²⁻⁴⁻⁷⁻¹².

O alto grau de polimorfismo do kDNA juntamente com regiões conservadas¹⁰⁻¹²⁻¹⁴⁻¹⁷ favorecem a sua utilização para fins taxonômicos e genéticos². Por essa razão, os iniciadores utilizados neste trabalho possuem como alvo sequências do minicírculo, possibilitando a distinção entre *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*⁸⁻²⁶.

Os iniciadores RV1 e RV2 têm sido utilizados com sucesso na identificação de *Leishmania (Leishmania) chagasi* em sangue e urina de humanos¹⁵⁻²⁹⁻⁴⁷, cães¹⁵⁻¹⁸⁻²⁰, e em flebotomíneos de Mato Grosso do Sul⁴⁶, enquanto a1/a2 e b1/b2 são os iniciadores que permitem, respectivamente, a identificação de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em amostras provenientes de biópsia de lesão em humanos²³⁻²⁶⁻³⁷.

A utilização destes iniciadores na identificação de espécies de *Leishmania* em isolados humanos criopreservados, por meio da reação em cadeia da polimerase constitui o objetivo deste trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados. Trata-se de um estudo com 39 isolados de *Leishmania sp* criopreservados no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), coletados no período de janeiro de 2007 a janeiro de 2008, à exceção de uma amostra do ano de 2003. Amostras de sangue medular ou de tecido da borda da lesão foram coletadas de pacientes com leishmaniose visceral e tegumentar, provenientes de diferentes instituições de saúde de Mato Grosso do Sul, e encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia para diagnóstico, caracterizando-as como amostras de conveniência. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Cultura. As amostras foram cultivadas em meio Nicolle, Novy e McNeal (NNN) com fase líquida Schneider's medium, pH 7.2 e 20% soro fetal bovino. Após o isolamento e crescimento, para a obtenção de massa parasitária, a mesma foi armazenada com glicerol em nitrogênio líquido.

Extração de DNA. As extrações de DNA a partir das formas promastigotas em cultura foram realizadas pelo método de fenol-clorofórmio¹.

Reação em cadeia da polimerase. A reação foi padronizada com os DNAs controle fornecidos pelo Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (Belo Horizonte, Brasil): *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75), *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8), levando-se em consideração o tamanho do produto esperado e as temperaturas de anelamento dos *primers*.

Para *Leishmania (Leishmania) chagasi* foram utilizados os iniciadores RV1- CTTTCTGGTCCCGGGTAGG e RV2- CACCTGGCCTATTTCACCA com produto esperado de 145pb²⁰, para *Leishmania (Leishmania) amazonensis* os iniciadores a1- TGCGAGGATAAAGGGAAAGAA e a2- TGCCCTGACTTGCATGTCTA com produto esperado de 62pb²⁶, e para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, os iniciadores b1- GTGGGCGTATCTGCTGATGAC e b2 - CAAAAAGCGAGGGACTGCGGA com produto esperado de 103pb²⁶.

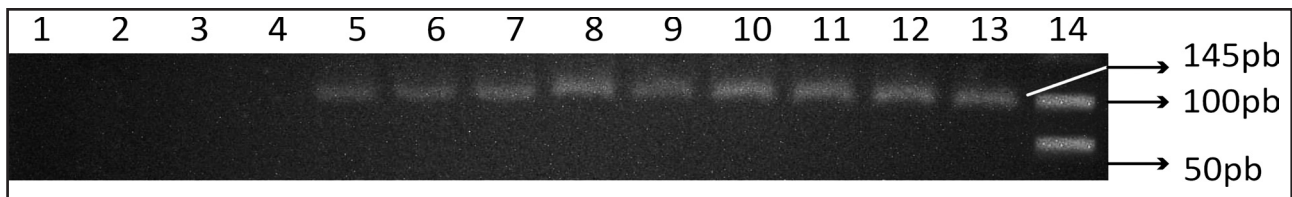
Condições da PCR: a) RV1/RV2 com volume de 25µL: tampão 2X Phoneutria, dNTPs 0,2mM, MgCl₂ 0,3mM, iniciadores 0,16pmol, Taq polimerase Phoneutria 4U, DNA 0,5µL, água 19,4µL e termociclador BIOER modelo XP cycler. Os ciclos foram de 95°C - 5min, 40 ciclos de: 94°C - 30 seg, 70°C - 1 min, 72°C - 1 min e extensão final de 72°C - 10 min. b) a1/a2 com volume de 25µL: tampão 2X Phoneutria (Belo Horizonte, MG), dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 0,3mM, iniciadores a1/a2 0,4pmol, Taq polimerase 4U Phoneutria, DNA 0,5µL, água 18,8µL e termociclador BIOER modelo XP cycler. Os ciclos foram de 95°C - 5min, 35 ciclos de: 95°C - 30 seg, 55°C - 1 min e 30 seg, 72°C - 1 min/ 30 seg e extensão final de 72°C - 10 min. c) b1/b2 com volume de 25µL: tampão 2X Phoneutria, dNTPs 0,2mM, MgCl₂ - 0,3mM, iniciadores a1/a2 1 pmol, Taq polimerase 4U Phoneutria, DNA 0,5µL, água 17,3µL e termociclador BIOER modelo XP cycler. Os ciclos foram de 95°C - 5 min, 35 ciclos de: 95°C - 30 seg, 70°C - 1 min e 30 seg, 72°C - 1 min/30 seg e extensão final de 72°C - 10 min.

Eletroforese em gel de agarose. Realizou-se a eletroforese submarina horizontal em gel de agarose a 2% com tampão tris-EDTA-acetato (TAE) 1X pH 8,0 a 80v e 400mA (tris-acetato 0,04M, EDTA 0,001M⁴²). Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e visualizados em luz ultravioleta. Para a análise dos produtos da PCR a1/a2, o gel foi de 3% em tampão TBE (tris base, ácido bórico e EDTA).

RESULTADOS

Os resultados da amplificação dos DNAs das cepas referência para as três espécies de *Leishmania* com os iniciadores RV1/RV2, a1/a2 e b1/b2 estão apresentados nas **Figuras 1, 2 e 3**, respectivamente, junto a alguns isolados do presente estudo.

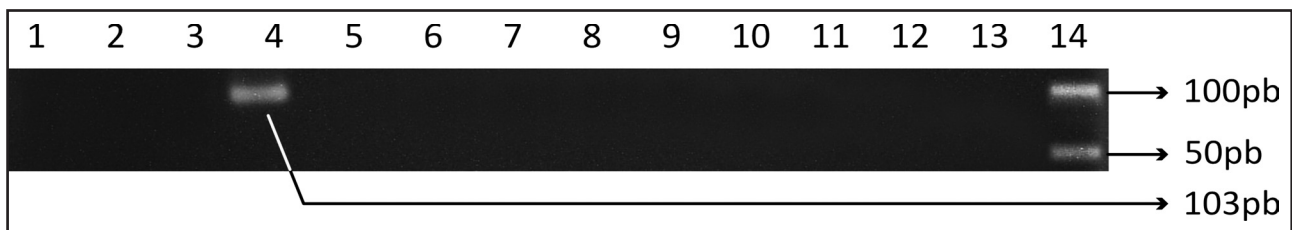
Foram avaliados pela PCR 39 isolados humanos, sendo que 37 foram positivos para *Leishmania (Leishmania) chagasi* e dois para *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (**Tabela 1**). Não se identificou *Leishmania (Viannia) braziliensis* nas amostras analisadas.


FIGURA 1

Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores RV1/RV2: 1- Cepa-referência *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), 2- Cepa-referência *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8), 3- Controle negativo, 4- MHOM/BR/2007/WP, 5- MHOM/BR/2007/TJAJ, 6- Cepa-referência *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75), 7- MHOM/BR/2007/JTN, 8- MHOM/BR/2007/WLN, 9- MHOM/BR/2007/JRC, 10- MHOM/BR/2007/DBA, 11- MHOM/BR/2007/CR, 12- MHOM/BR/2007/MAN, 13- MHOM/BR/2007/LSB, 14- Marcador de 50pb.


FIGURA 2

Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores a1/a2: 1- Cepa-referência *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75), 2- Cepa-referência *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) 3- Controle negativo, 4- Cepa-referência *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8), 5- MHOM/BR/2007/WP, 6- MHOM/BR/2007/TJAJ, 7- MHOM/BR/2007/JTN, 8- MHOM/BR/2007/WLN, 9- MHOM/BR/2007/JRC, 10- MHOM/BR/2007/DBA, 11- MHOM/BR/2007/CR, 12- MHOM/BR/2007/MAN, 13- MHOM/BR/2007/LSB, 14- Marcador de 50pb.


FIGURA 3

Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores b1/b2: 1- Cepa-referência *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75), 2- Cepa-referência *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8), 3- Controle negativo, 4- Cepa-referência *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) 5- MHOM/BR/2007/WP, 6- MHOM/BR/2007/TJAJ, 7- MHOM/BR/2007/JTN, 8- MHOM/BR/2007/WLN, 9- MHOM/BR/2007/JRC, 10- MHOM/BR/2007/DBA, 11- MHOM/BR/2007/CR, 12- MHOM/BR/2007/MAN, 13- MHOM/BR/2007/LSB, 14- Marcador de 50pb.

TABELA 1

Resultados das amplificações por PCR em isolados de *Leishmania* no Estado de Mato Grosso do Sul.

Isolados	RV1/ RV2	a1/a2	b1/b2	Procedência	Forma clínica	Isolados	RV1/RV2	a1/a2	b1/b2	Procedência	Forma clínica
MHOM/BR/2007/JTN	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/FFF	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/WLN	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/RM	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/JRC	+	-	-	Glória de Dourados	IV	MHOM/BR/2007/SALG	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/DBA	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/JGO	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/CR	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/MC	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/MAN	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/JCDS	+	-	-	Bodoquena	IV
MHOM/BR/2007/LSB	+	-	-	Ponta Porã	IV	MHOM/BR/2007/JFVL	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/JVCS	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/PHTS	+	-	-	Anastácio	IV
MHOM/BR/2007/SALS	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/LPS	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/WMS	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/LBO	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/SMA	+	-	-	Aquidauana	IV	MHOM/BR/2007/JVF	+	-	-	Rochedo	IV
MHOM/BR/2007/FSB	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/WCS	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/HRP	+	-	-	Terenos	IV	MHOM/BR/2007/VL	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/KSG	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/ACB	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/ARL	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/WP	-	+	-	Chapadão do Sul	IT
MHOM/BR/2007/ES	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2008/IGS	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/AMC	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2003/TKV	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/NPN	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2008/GRN	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/LFSP	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/TJAJ	-	+	-	Amazonas	IT

IV: leishmaniose visceral, IT: leishmaniose tegumentar, RV1/RV2: iniciadores utilizados na identificação de *Leishmania (Leishmania) chagasi*. a1/a2: iniciadores utilizados na identificação de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, b1/b2: iniciadores utilizados na identificação de *Leishmania (viannia) braziliensis*.

DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul encontra-se em franco processo de expansão, ocorrendo em 48 de seus 78 municípios, com crescente aumento no número de casos, e a confirmação de 1.519 casos, durante o período de 2000 a setembro de 2008. Destes, 258 ocorreram no ano de 2007, mantendo-se a morbidade como importante motivo de preocupação para a saúde pública⁴⁵.

A leishmaniose tegumentar é endêmica no estado, com registro de casos desde 1975, atingindo o homem quando este entra em contato com o foco natural da parasitose, demonstrando, até o momento, um padrão de transmissão de caráter ocupacional^{13 30}.

Embora a presença de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* já tenha sido constatada na população humana^{13 31 33}, canina^{9 43} e em flebotomíneos^{32 43 46} do estado ainda são escassos os estudos sobre a identificação específica dos agentes de leishmanioses em suas áreas de ocorrência.

No presente estudo, 37 isolados regionais eram de pacientes portadores de leishmaniose visceral e foram positivos para os iniciadores RV1/RV2 na reação em cadeia da polimerase, o que permitiu, mais uma vez, a identificação de *Leishmania (Leishmania) chagasi* como agente etiológico da parasitose, corroborando ainda, as citações da literatura quanto à utilização desses iniciadores na caracterização específica de *Leishmania*^{15 20}.

Estes mesmos iniciadores também foram úteis para a detecção dessa espécie de parasito em flebotomíneos capturados na área urbana de Campo Grande⁴⁶, município considerado de transmissão intensa, responsável por 55% dos casos confirmados no ano de 2007⁴⁵, e detentor do maior (29) número de amostras no presente trabalho.

Leishmania (Leishmania) amazonensis foi identificada em um paciente com a forma cutânea de leishmaniose tegumentar, com local de infecção em um município do interior do estado. Essa espécie já foi encontrada em outros casos humanos da parasitose¹³, além de já ter sido observada em felino⁵⁰, cães⁴³, e flebotomíneos^{43 46}, demonstrando que sua circulação e distribuição geográfica, podem ser mais amplas do que se supõe, considerando que os casos são procedentes de diferentes regiões do Estado.

O outro caso trata-se de paciente procedente do Estado do Amazonas, com a forma cutânea da parasitose, que teve como local de diagnóstico Campo Grande. Essa espécie de parasita é frequentemente relatada na região da Amazônia legal, juntamente com *Leishmania (Viannia) guyanensis*^{21 41}.

Assim, com os três pares de iniciadores, foi possível a identificação de duas espécies de *Leishmania*, tendo em vista a detecção de *Leishmania (Leishmania) chagasi* por meio de RV1/RV2, o encontro de dois isolados positivos para *Leishmania (Leishmania) amazonensis* quando da utilização de a1/a2, e a ausência de *Leishmania (Viannia) braziliensis* com b1/b2.

A ausência dessa espécie de parasito pode ter ocorrido pelo reduzido número de amostras analisadas, uma vez que, na maioria das vezes, o diagnóstico da leishmaniose tegumentar é realizado no município de origem do paciente, onde a infraestrutura laboratorial não possibilita o isolamento do parasito para posterior identificação específica do agente etiológico.

No caso da leishmaniose visceral, embora o número de amostras analisadas (37), possa parecer reduzido, vem contribuir no processo de diagnóstico da parasitose, tendo em vista que com sua recente introdução no estado, e as dificuldades ainda existentes no diagnóstico clínico e laboratorial, o Laboratório de Parasitologia, além de ser referência para a confirmação dos casos, vem realizando o isolamento e a criopreservação das amostras, possibilitando a ampliação dos estudos clínicos e epidemiológicos sobre essa parasitose no estado.

É importante ressaltar que outras técnicas, além da PCR, podem ser utilizadas para a identificação de espécies de *Leishmania*, tais como, eletroforese de enzimas¹⁶, considerada padrão ouro¹¹, anticorpos monoclonais^{25 40}, métodos moleculares como PCR multiplex^{19 38 39}, PCR-RFLP (PCR-polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição)^{6 22} e RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso)^{3 34}.

Enquanto o método de eletroforese de enzimas requer o cultivo e isolamento do parasita, a técnica de anticorpos monoclonais é limitada pela possibilidade de reações cruzadas. Já os testes moleculares baseados na PCR e variantes, exigem laboratórios equipados, reagentes de alto custo como enzimas de restrição no caso de PCR-RFLP, e a RAPD apresenta pouca reprodutibilidade. Por outro lado, a PCR padrão apresenta elevada sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade^{2 52}.

A escolha, neste trabalho, de três alvos de amplificação em separado, ao contrário da PCR multiplex, foi consequência da experiência anterior com os iniciadores RV1/RV2 por meio da PCR padrão, cuja utilização possibilitou a identificação de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, em flebotomíneos na região⁴⁶. A padronização de um teste multiplex com os três pares de iniciadores testados poderá ser realizada em estudos posteriores.

Desta forma, a maior contribuição do trabalho é a descrição de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, como o agente detectado nos casos de leishmaniose visceral, em Mato Grosso do Sul, além de possibilitar a implantação da PCR para no futuro permitir a identificação molecular das espécies que ocorrem em diferentes hospedeiros de *Leishmania* no estado, abrindo ainda a perspectiva de utilização desta técnica no diagnóstico individual das leishmanioses, possibilitando adequada conduta clínica e terapêutica dos pacientes.

AGRADECIMENTOS

À Fundect/MS pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de pesquisa, à Embrapa Gado de Corte pelo apoio laboratorial, e ao Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz (Belo Horizonte, Brasil), pela doação das cepas referência.

REFERÊNCIAS

- Bañuls AL, Brisse S, Sidibe I, Noël S, Tibayrenc M. A phylogenetic analysis by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting of the *Leishmania* genome project Friedlin reference strain. *Folia Parasitologica* 46:10-14, 1999.
- Bañuls A, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Advances in Parasitology* 64:1-109, 2007.
- Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, Conceição-Silva F, Rosalino CM, Salgueiro MM, Pacheco RS. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Experimental Parasitology* 121:317-322, 2009.
- Barker DC. Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology* 99:125-146, 1989.
- Barral A, Pedral Sampaio D, Grimaldi Jr G, Momen H, McMahon-Pratt D, Jesus AR, Almeida R, Badaró R, Barral Neto M, Carvalho EM, Jonhson WD. Leishmaniasis in Bahia, Brazil; evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44:536-546, 1991.
- Botilde Y, Laurent T, Tintaya WQ, Chicharro C, Cañavate C, Cruz I, Kuhl K, Schönián G, Dujardin JC. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum* infection. *Genetics and Evolution* 6:440-446, 2006.
- Bracho CO, Quintana LP, Arenas SM, Parra MR. Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis diagnosis: a validation study. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102:549-554, 2007.
- Brewster S, Barker DC. Analysis of minicircle classes in *Leishmania (Viannia)* species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96:55-63, 2002.
- Cortada VM, Dorval ME, Souza Lima MA, Oshiro ET, Meneses CR, Abreu-Silva AL, Cupolillo E, Souza CS, Cardoso FO, Zaverucha do Valle T, Brazil RP, Calabrese KS, Gonçalves da Costa SC. Canine visceral leishmaniasis in Anastácio, Mato Grosso do Sul State Brazil. *Veterinary Research* 28:365-474, 2004.
- Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98:12-17, 2004.
- Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of the New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50:296-311, 1994.
- Degrave W, Fernandes O, Campebell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* a mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 89:463-469, 1994.
- Dorval MEC, Oshiro ET, Cupolillo E, Castro ACC, Alves T. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39:43-46, 2006.
- Fernandes O, Catanho MP, Segura I, Labrada LA, Derre R, Saraiva N, Degrave W. Minicircle variable region probes for characterization of *Leishmania (Viannia)* species. *The Journal of Parasitology* 85:563-568, 1999.
- Ferroglio A, Romano A, Trisciuglio AM, Poggib E, Ghiggic P, Sacchia A, Biglino D. Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100:636-641, 2006.
- Figueira LP, Pinheiro FG, Nogueira RW, Nery LCR, Mota KC, Franco AMR. Dinâmica da Leishmaniose Tegumentar no assentamento Iporá-AM, BR: II – Caracterização isoenzimática de isolados humanos humanos de *Leishmania* spp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41:194, 2008.
- Franco AM, Machado GM, Moreira CF, Grimaldi Jr G. Minicircle kDNA microheterogeneity in *Endotrypanum* indicate diversity within this genus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95:189-191, 2000.
- Gomes AHS, Ferreira, IMR, Lima, MLSR, Cunha, EA, Garcia AS, Araújo MFL, Pereira-Chioccola VL. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 144:234-241, 2007.
- Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-Step Multiplex PCR Assay for Characterization of New World *Leishmania* Complexes. *Journal of Clinical Microbiology* 36:1989-1995, 1998.
- Lachaud L, Marchegui-hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 40:210-215, 2002.
- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Souza AAA, Braga RR, Ishikawa EAY. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the ecoepidemiology of the disease in Amazônia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 89:435-443, 1994.
- Luz ZM, Silva AR, Silva FO, Caligiorme RB, Oliveira E, Rabello A. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104:62-66, 2009.
- Marco JD, Uezato H, Mimori T, Barroso PA, Korenaga M, Nonaka S, Basombrío MA, Taranto NJ, Hashiguchi Y. Are cytochrome *b* gene sequencing and polymorphism-specific polymerase chain reaction as reliable as multilocus enzyme electrophoresis for identifying *Leishmania* spp. from Argentina? *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 75:256-260, 2006.
- Michalsky EM, Fortes-Dias CI, Pimenta PFP, Secundino NFG, Dias E. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 5:255-259, 2002.
- Mimori T, Grimaldi Jr G, Kreutze RD, Gomez EA, McMahon-Pratt D, Tesh RB, Hashiguchi Y. Identification, using isoenzyme electrophoresis and monoclonal antibodies, of *Leishmania* isolated from humans and wild animals of Ecuador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40:154-158, 1989.
- Mimori T, Sasaki J, Nakata M, Gomez EA, Uezato H, Nonaka S, Hashiguchi Y, Furuya M, Saya H. Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. *Gene* 210:179-186, 1998.
- Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Brasília, 2006.
- Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose tegumentar. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Brasília, 2007.
- Motazedian M, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam G, Mikaeili F. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 60:151-154, 2008.
- Nunes VLB. Condicionantes para a transmissão de leishmanioses em assentamento agrícola do INCRA e adjacências, Planalto do Bodoquena, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 1998, 1999. Doutorado [Tese de Doutorado em Saúde Pública]. Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.
- Nunes VLB, Dorval MEC, Oshiro ET, Noguchi RC, Arão LB, Hans Filho G, Espíndola MA, Cristaldo G, Rocha HC, Serafine LN, Santos D. Estudo epidemiológico sobre Leishmaniose Tegumentar (LT) no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul - estudos na população humana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 28:185-193, 1995.
- Nunes VLB, Galati EAB, Cardozo C, Rocca MEG, Andrade ARO, Santos MFC, Aquino RB, Rosa D. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área urbana do município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 52:446-451, 2008.
- Oliveira ALL, Paniago, AMM, Dorval MEC, Oshiro ET, Leal CR, Sanches M, Cunha RV, Bóia, MN. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39:446-450, 2006.
- Oliveira JP, Fernandes F, Cruz AK, Trombela V, Monteiro E, Camargo AA, Barral A, Oliveira CI. Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. *Kinetoplastid Biology and Disease* 6: 5-8, 2007.
- Paiva BR, Passos LN, Falqueto A, Malafronte RS, Andrade HF. Single step polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania (Viannia)* subgenus. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46:335-338, 2004.
- Paiva BR, Secundino NF, Pimenta PF, Galati EAB, Malafronte RS. Standardization of conditions for PCR detection of *Leishmania* spp. DNA in sandflies (Diptera, Psychodidae). *Cadernos de Saúde Pública* 23:87-94, 2007.

37. Pereira EF, Thomaz-Soccol V, Lima HC, Thomaz-Soccol A, Castro EA, Mulinari-Brenner F, Queiroz-Telles F, Luz E. Molecular diagnosis of leishmaniasis in the Parana' state of southern Brazil. *Experimental Dermatology* 17:1024-1030, 2008.
38. Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Figueiredo Barbosa AF, Britto CC. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99:905-913, 2005.
39. Pita-Pereira D, Cardoso MA, Alves CR, Brazil RP, Britto C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Tropica* 107:66-69, 2008.
40. Rodríguez-Barraquer I, Góngora R, Prager M, Pacheco R, Montero LM, Navas A, Ferro C, Miranda MC, Saravia NG. Etiologic Agent of an Epidemic of Cutaneous Leishmaniasis in Tolima, Colombia. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78:276-282, 2008.
41. Romero GAS, Guerra MVE, Paes MG, Macêdo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. *Clinical Infectious Diseases* 32:1304-1312, 2001.
42. Sambrook J, Fritsch WF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* New York, Cold Spring Harbour Laboratory, 1989.
43. Savani ESM, Nunes VLB, Galati EAB, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Veterinary Parasitology* 160: 18-24, 2009.
44. Schallig HDFH, Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine & International Health* 7:641-651, 2002.
45. Secretaria de Estado de Saúde, Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) Campo Grande, MS, 2009.
46. Silva EA, Andreotti R, Dias ES, Barros JCM, Brazuna JC. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Experimental Parasitology* 119:343-348, 2008.
47. Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Brazil RP. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genetics and Molecular Research* 2:251-257, 2004.
48. Silva ES, Pacheco RS, Gontijo CMF, Carvalho IR, Brazil RP. Visceral Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo* 44:145-149, 2002.
49. Singh S, Sivakumar, R. Recent Advances in the Diagnosis of leishmaniasis. *Journal of Postgraduate Medicine* 49:55-60, 2003.
50. Souza AI, Barros EM, Ishikawa E, Ilha IM, Marin GR, Nunes VL. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 128:41-45, 2005.
51. Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 90:31-37, 2004.
52. Wilson SM. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: field applications and practicalities. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 89: 95-100, 1995.

ARTIGO 2

A comparative analysis of methods for diagnosing visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil

Submetido à revista The Journal of Venomous Animals and Toxins Tropical
Diseases (JVAT)

A comparative analysis of methods for diagnosing visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil

Lima-Junior M S C (1), Zorzenon D C R (1), Dorval M E C (1), Oshiro E T (1), Pontes E R J C (1), Herrera E C (2), Nardi C H (2), Andreotti R(3), Matos M F C (1*)

(1) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil; (2) LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brazil; (3) Embrapa Beef Cattle, Campo Grande, MS, Brazil

*Corresponding author: Departamento de Farmácia-Bioquímica, CCBS, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS 79070-900. Tel. +55-67-3345-7358. Email: maria.matos@ufms.br

ABSTRACT: Although the Brazilian state of Mato Grosso do Sul has become an endemic area for visceral leishmaniasis, only parasitological methods are locally available for diagnosis of the disease. The purpose of this investigation was to evaluate the effectiveness of PCR and real-time (RT) PCR for diagnosing human visceral leishmaniasis in peripheral blood samples. DNA extraction was carried out using Promega Wizard Genomic kits. PCR based on RV1 and RV2 primers yielded 145-bp amplicons. RT-PCR used the same primers and Sybr Green Rox Plus mix. Of the 100 samples, 65 tested positive by PCR, 62 by RT-PCR, and 45 by bone marrow aspirate smear. Of 96 samples, 13.5% tested positive on cultures. RT-PCR showed higher agreement with PCR (95%) than with bone marrow smears (83%) or NNN culture (53.1%). The results of RT-PCR and PCR using RV1 and RV2 primers suggest that these molecular techniques are a valid tool for diagnosing visceral leishmaniasis, given their greater agreement with each other than with the results obtained using conventional methods.

Keywords: visceral leishmaniasis, diagnosis, PCR, real-time PCR

Conflicts of interest: No conflict exists.

Financial source: FUNDECT-MS, Brazil.

INTRODUCTION

Diagnosis of visceral leishmaniasis (VL) can be unequivocally reached by visualization of *Leishmania* sp. amastigotes in stained smears of spleen, liver, bone marrow, and lymph node aspirates (1). Sensitivity of the method has been reported at 95-98% for spleen aspirates (2), 76-91% and 52-89% for liver and bone marrow aspirates, respectively (3), and 52-69% for lymph node aspirates (3, 4), whereas parasite culture on axenic media provides sensitivity levels of over 90% (5).

Serological reactions, another approach to VL diagnosis, differ in sensitivity and specificity, and specific antibodies are retained after treatment, precluding assessment of therapeutic response. Difficulties are compounded by cross-reactions with other diseases, including trypanosomiasis, Hansen's disease, tuberculosis, and other leishmaniasis, hindering conclusive diagnosis, particularly in areas where these diseases overlap (6).

RV1 and RV2 primers, developed by Ravel et al. (7) and adapted by Le Fichoux et al. (8), target minicircles of *L. infantum* kDNA, amplifying a 145-bp fragment. The present experiments were designed for real-time (RT) PCR based on RV1 and RV2 primers, assuming sensitivity of 10–4 parasites per assay (9). The experimental design also took into account the absence of information on the use of these primers in RT-PCR, and the fact that the authors were experienced in use of the primers (10).

RV1 and RV2 primers have been successfully used to identify *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in human isolates from Novy–MacNeal–Nicolle (NNN) cultures (10), human blood, and urine (8, 11), as well as in isolates from dogs (12, 13) and phlebotomines (14).

The purpose of this investigation was to conduct a comparative analysis of four methods for VL diagnosis: RT-PCR, PCR, bone marrow smear, and NNN culture.

The study included 100 human subjects with clinical signs of visceral leishmaniasis seen at hospitals in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

The investigation was approved by the Committee for Ethics in Research in Human Beings, of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Peripheral blood samples were collected in EDTA-coated 4 mL tubes. Bone marrow aspirates were individually homogenized and used to prepare thin smears ($n = 100$), which were subsequently fixed in methanol and Giemsa-stained.

For in vitro culture of the parasite, bone marrow aspirates ($n = 96$, since four of the original samples were too small to be viable for culturing) were seeded in NNN medium, with Schneider's medium at pH 7.2 as the liquid phase and 20% bovine fetal serum.

DNA extraction was performed using a Wizard Genomic DNA Purification[®] kit (Promega) on 300 μ L of peripheral blood. PCR performed with RV1 and RV2 primers yielded 145-bp amplicons. The 25 μ L reaction mixture consisted of 1x buffer, 0.20 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 0.16 pmol of each primer (RV1, RV2), 4 U of Taq polymerase recombinant (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 19.75 μ L of water, and 1 μ L of DNA. The mixture was cycled in an XP thermal cycler (Bioer) as follows: 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 30 s at 95 °C, 1.5 min at 54.5 °C, and 1.5 min at 72 °C, with a final extension of 10 min at 72 °C. Submarine horizontal gel electrophoresis was performed in 2% agarose with 1x TAE buffer at pH 8.0, 80 V, and 400 mA (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA). Gels were visualized under ultraviolet after ethidium bromide staining (0.5 μ g/mL).

Amplifications for RT-PCR were performed on a Line-Gene K FQD-48A system (Bioer, Japan). Each reaction was run using a total of 12.0 μ L of PCR mix plus 0.5 μ L of DNA (12.5 μ L). The 12.0 μ L PCR mix was composed of 6.25 μ L of SYBR Green Rox Plus mix (Taq-Star DNA polymerase, reaction buffer, dNTPs, SYBR Green I, and ROX) code 13-200RTSY, 0.5 μ L each of primers RV1 and RV2, and 4.75 μ L of water. Cycling began with 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 30 s at 95 °C, 1.5 min at 55 °C, and 1.5 min at 72 °C, with a final extension of 10 min at 72 °C.

In both molecular methods, reactions were standardized using *L. (L.) chagasi* MHOM/BR/74/PP/75 as DNA control, provided by the Leishmaniasis Laboratory of the Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz (Belo Horizonte, Brazil).

To validate the results, a melting curve was obtained using the DNA control described above, with a resulting melting temperature of approximately 84.5 °C. The expected amplicon melting temperatures followed the same patterns for all samples.

The slope of the standard curve was -3.30 and the correlation coefficient (R^2) was -0.998 .

Of the 100 samples, 65 tested positive by PCR, 62 by RT-PCR, and 45 by bone marrow aspirate smears. Of the 96 samples with sufficient volume, 13 tested positive on NNN cultures. Table 1 shows the distribution, by techniques, of positive and negative results, revealing that agreement was highest ($\kappa = 0.89$, $p < 0.001$) between RT-PCR and PCR.

Figure 1 depicts the amplifications obtained using PCR with RV1/RV2 primers, with estimated 145-bp amplicons.

PCR-based detection of parasite DNA in peripheral blood was found to be more effective than the other methods evaluated. Use of kDNA targets was a contributory factor to superior performance, since their high number of copies increases sensitivity (15) thus corroborating earlier findings on the advantages of performing this technique with RV1 and RV2 primers for VL diagnosis (16, 17).

RT-PCR was chosen for comparison owing to its several advantages, including shorter run times (since electrophoresis is no longer required) and reduced risk of contamination (since amplification can be detected while the tube is still closed) (18). RT-PCR and PCR have similar limits of resolution, of at least 0.1 parasite (19).

Agreement between RT-PCR and bone marrow smear results was lower ($\kappa = 0.67$) than that between RT-PCR and PCR ($\kappa = 0.89$). This finding suggests that PCR and RT-PCR performed on peripheral blood can be a valuable addition to the arsenal of conventional methods currently in use. Also, peripheral blood provides a less invasive alternative to bone marrow aspirates, exposing patients to lower risks and facilitating sample collection from endemic areas, especially in cases where the disease is suspected in patients with negative parasitological results (20).

Although reported to have sensitivity levels of over 90% (5), cultures in specific media are not routinely performed, owing to maintenance requirements, growth periods of up to 30 days, and lower detection rates (21). In the present investigation, culture was the method showing the lowest agreement ($\kappa = 0.19$) with RT-PCR, a finding mirroring results of a recent comparison between culture and PCR (22). Melting curves in duplicate samples, generated from different results at the end of real-time PCR amplification (Figure 2).

In Mato Grosso do Sul, VL remains a public-health issue as it has now spread to 56 of the 78 counties in the state, with 1729 confirmed cases in the period 2000-2008 (23). Locally, only parasitological (bone marrow smear and NNN culture) and serological methods are available for diagnosis of the disease at government-run hospitals and health centers.

This study contributes to the discussion on which methods should be implemented for routine laboratory diagnosis of VL in endemic areas. Constituting a preliminary study on the use of RT-PCR for VL diagnosis, it can be complemented with further investigations based on larger samples (possibly including VL patients from other endemic areas) and extended so as to compare PCR and RT-PCR with serological methods (particularly rapid tests).

As shown by the present results, molecular techniques prove more effective than conventional parasitological methods, having the added benefit of being able to identify specific etiologic agents. Also, molecular techniques constitute potential alternatives for early diagnosis of VL, facilitating decision-making in laboratory management.

ACKNOWLEDGMENTS

This investigation was supported by the Brazilian Ministry of Health, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), and the Fundação de Desenvolvimento de Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul (FUNDECT-MS, Brazil, research grant to M.F.C. Matos and student grant to M.S.C. Lima Junior). The authors also wish to express their thanks to the Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz (Belo Horizonte, Brazil), for donating the DNA controls.

REFERENCES

1. Chappuis F, Rijal S, Jha UK, Desjeux P, Kaki BMS, Koiala S, Loutan L, Boelaert M. Field validity, reproducibility and feasibility of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in rural Nepal. *Trop Med Int Health* 2006;11(1):31-40.
2. Chulay JD, Bryceson AD. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1983;32(3):475-479.

3. Zijlstra EE, Siddig AM, El-Hassan AM, El-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, Kager PA. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;86(5):505-507.
4. Siddig M, Ghalib HW, Shillington DC, Petersen EA. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(1):66-68.
5. Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006;123(3):311-330.
6. Dourado ZF, Silva HD, Silveira – Lacerda EP, Garcia-Zapata MTA. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromato gráficos (rk39). *R Patol Trop.* 2007; 36 (3): 205-214.
7. Ravel S, Cuny G, Reynes J, Veas F. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Trop.* 1995;59(3):187-196.
8. Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuvre JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, Rousseau D, Kubar J. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1953-1957.
9. Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP, Bastien P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitol.* 2002;125(3):197-207.
10. Lima Junior MSC, Andreotti R, Dorval MEMC, Oshiro ET, Oliveira AG, Matos MFC. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(3):303-307.
11. Motazedian M, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam G, Mikaeili F. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60(2):151-154.
12. Gomes AHS, Ferreira IMR, Lima MLSR, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MFL, Pereira-Chiocola VL. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2007;144(3-4):234-241.
13. Ferroglio A, Romano A, Trisciuglio AM, Poggib E, Ghiggic P, Sacchia A, Biglino D. Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from

infected dogs and humans by PCR-RFLP. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100(7):636-641.

14. Silva EA, Andreotti R, Dias ES, Barros JCM, Brazuna JC. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Exp Parasitol.* 2008;119(3):343-348.

15. Degraive W, Fernandes O, Campebell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994;89(3):463-469.

16. Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, Toga B, Quilici M. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol.* 1994;32(3):746-749.

17. Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E, Dedet JP, Bastien P. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):236-240.

18. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. *J Clin Microbiol.* 2008;46(6):1897-1900.

19. Tupperwar N, Vineeth V, Rath S, Vaidya, T. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;61(1):23-30.

20. Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, Kroon NC, Schoone GJ, Khalil ET, El-Hassan AM, Kager PA. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 1997;35(10):2454-2457.

21. Allahverdiyev DM, Bagirova M, Uzun S, Alabaz D, Aksaray N, Kocabas E, Koksall F. The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(2):276-280.

22. Fraga TL, Brustoloni Y M, Lima RB, Dorval MEC, Oshiro ET, Oliveira J, Oliveira ALL, Pírmex C. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105(3): 310-313.

23. Mato Grosso do Sul. Governo do Estado de Mato Grosso do Sul. Secretaria de Estado de Saúde. SINAN/MS. Acess:03/10/10. Available from: <http://www.saude.ms.gov.br/>.

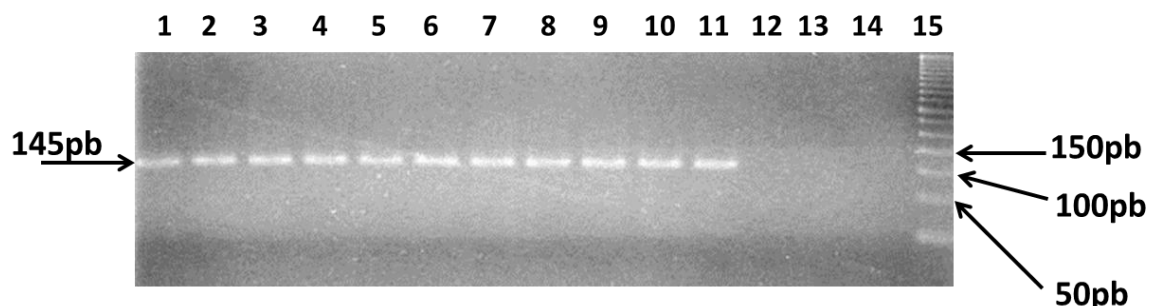


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products using primers RV1/RV2. 1: MHOM/BR/2008/MS1139; 2: MHOM/BR/2008/MS1220; 3: MHOM/BR/2008/MS1195; 4: MHOM/BR/2008/MS1252; 5: MHOM/BR/2008/MS1251; 6: MHOM/BR/2008/MS1240; 7: MHOM/BR/2008/MS1239; 8: MHOM/BR/2008/MS1186; 9: MHOM/BR/2008/MS1261; 10: MHOM/BR/2008/MS1287; 11: *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/BR/2008/MS1277); 12: MHOM/BR/2008/MS1322; 13: MHOM/BR/2008/MS1324; 14: MHOM/BR/2008/MS1325; 15: 50-bp molecular marker.

Table 1. Statistical comparison of results of real-time PCR and conventional PCR (both performed on peripheral blood samples) and parasitological methods (bone marrow aspirate smears and cultures) in patients with clinical suspicion of visceral leishmaniasis (n = 100).

Test	RT-PCR		Agreement (%)	κ	p
	Positive	Negative			
PCR					
Positive	61	4	95.0	0.89	< 0.001
Negative	1	34			
Bone marrow smear					
Positive	45	–	83.0	0.67	< 0.001
Negative	17	38			
Culture*					
Positive	13	–	53.1	0.19	< 0.001
Negative	45	38			

*In four cases, sample volume was insufficient for viable culture.

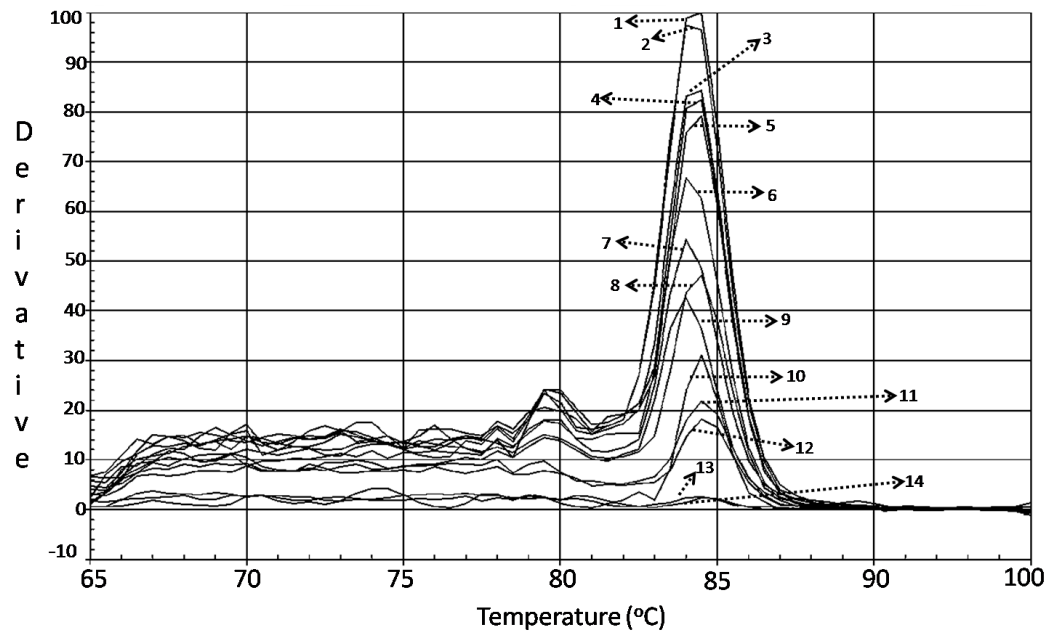


Figure 2 - Melting curves in duplicate samples, generated from different results at the end of real-time PCR amplification. 1-2: *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75); 4-5: MHOM/BR/2008/MS1220; 3 and 6: MHOM/BR/2008/MS1195; 7-8: MHOM/BR/2008/MS1139; 9-10: MHOM/BR/2008/MS1252; 11-12: MHOM/BR/2008/MS1346; 13-14: negative control.

ARTIGO 3

Diversidade genética de kDNA de *Leishmania* em Mato Grosso do Sul, Brasil

A ser submetido para publicação

Diversidade genética de kDNA de *Leishmania* em Mato Grosso do Sul, Brasil

Lima Junior, M. S. C. ⁽¹⁾, Dorval, M. E. C. ⁽¹⁾, Andreotti, R. ⁽²⁾, Alonso, D. P. ⁽³⁾, Ribolla, P. E. M. ⁽³⁾, Lorenz, A. P. L. L. ⁽¹⁾, Matos, M. F. C. ⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande (MS), Brazil; ⁽²⁾Embrapa Beef Cattle, Campo Grande (MS), Brazil; ⁽³⁾Universidade Estadual Paulista, Botucatu, UNESP

*Corresponding author: Departamento de Farmácia-Bioquímica, CCBS, UFMS. Caixa Postal 549. Campo Grande, MS 79070-900. Tel. +55-67-3345-7358. Email: mfcmatos@nin.ufms.br

Resumo

A leishmaniose é um relevante problema de saúde pública no Brasil, em particular no Mato Grosso do Sul, região endêmica que apresenta elevada incidência e mortalidade da parasitose. O objetivo deste trabalho é detectar a diversidade genética de kDNA em isolados de *Leishmania* obtidos de humanos diagnosticados com leishmaniose visceral ou tegumentar. A análise genética de kDNA foi realizado a partir da PCR-RFLP de minicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA) de 47 isolados de *Leishmania* obtidos de casos humanos, 45 provenientes de pacientes com leishmaniose visceral e dois com leishmaniose cutânea. A identificação das espécies foi realizada pela comparação entre as sequências depositadas no Genbank e aquelas obtidas pela PCR/ITS1 com posterior sequenciamento. Os isolados de leishmaniose visceral foram identificados como *L. chagasi*, com predomínio dos pacientes oriundos do município Campo Grande, MS (41). Os casos de leishmaniose tegumentar tiveram como agentes etiológicos identificados, *L. braziliensis* em paciente de MS e *L. major* em um indivíduo com história de viagem para Síria. Os resultados mostraram elevada heterogeneidade do kDNA de minicírculos com 30 genótipos diferentes. Este trabalho constitui a primeira análise genética de *Leishmania* oriunda de casos humanos no estado de Mato Grosso do Sul.

Introdução

No período de 1986 a 2010, foram registrados no Brasil 3.943 casos de leishmaniose visceral e no mesmo período 23.817 casos de leishmaniose cutânea (SINAM, 2011), o que evidencia a importância e a magnitude das leishmanioses na saúde pública do País. Em Mato Grosso do Sul, apesar da relevância dessas parasitoses, pouco se conhece sobre as espécies e a existência de diversidade genética dos agentes etiológicos que circulam em suas diferentes áreas de ocorrência.

O DNA do cinetoplasto representa 20-25% do DNA do parasito e consiste em uma rede de moléculas circulares, concatenadas, divididas em maxicírculos (25-50 cópias por célula) e minicírculos (10.000 cópias por célula) (BARKER; BUTCHER, 1983). Cada minicírculo tem aproximadamente 800pb de tamanho, com 200pb de região conservada e 600pb de região variável. A heterogeneidade da região variável tem sido explorada para discriminar entre linhagens de uma mesma espécie. A análise dos esquizodemas tem revelado que pode haver variações nas frequências das classes de minicírculos, conferindo diversidade (CORTES et al., 2006).

Recentemente Alonso et al., (2010) utilizaram a técnica do PCR/RFLP na detecção de heterogeneidade no kDNA de isolados de *Leishmania* obtidos de casos humanos e cães. Os parasitos cultivados demonstraram elevado grau de homogeneidade e os resultados mostraram que a heterogeneidade de minicírculos do kDNA depende principalmente da origem das amostras. Outro estudo de heterogeneidade de kDNA com amostras de *Leishmania* de Israel e Palestina provenientes de 22 cães e 2 pacientes encontrou pouca variabilidade (NASEREDDIN et al., 2009).

Cortes et al. (2006) amplificaram uma parte variável do minicírculos de kDNA de *L. infantum* e submeteram as amostras à digestão com diferentes endonucleases de restrição. Observaram um perfil polimórfico quando foram utilizadas, entre outras, as enzimas BglII, VspI, RsaI, HpaI e DdeI.

A análise dos polimorfismos nos fragmentos de restrição do kDNA é considerada um poderoso instrumento para estudos epidemiológicos e para mostrar variabilidade genética em amostras de *Leishmania* (BARKER; ARNOT, 1981; ANGELICI et al., 1989; PACHECO et al., 1999).

O objetivo deste trabalho é detectar a diversidade genética de kDNA em isolados de *Leishmania* obtidos de casos humanos diagnosticados com leishmaniose visceral ou tegumentar.

Material e métodos

Isolados

Trata-se de um estudo com 47 isolados de *Leishmania* sp criopreservados no Laboratório de Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Amostras de sangue medular ou de tecido da borda da lesão foram coletadas de pacientes com leishmaniose visceral ou tegumentar, provenientes de diferentes instituições de saúde de Mato Grosso do Sul, e encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia para diagnóstico, caracterizando-as como amostras de conveniência. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Cultura

As amostras foram cultivadas em meio Nicolle, Novy e McNeal (NNN) com fase líquida Schneider's medium, pH 7.2 e 20% soro fetal bovino. Após o isolamento e crescimento, para a obtenção de massa parasitária, a mesma foi armazenada com glicerol em nitrogênio líquido.

Extração

A extração de DNA foi obtido de cultura de (fenol-clorofórmio) foi realizada conforme Lima Junior et al. (2009).

PCR/ITS1 – Sequenciamento

Para identificação das espécies, foi realizada a amplificação por PCR da região ITS1 (internal transcribed spacer 1) com os pares de oligonucleotídeos LITSR e L5. 8S (SCHONIAN, et al., 2003).

Os produtos foram purificados enzimaticamente com o kit ExoSAP- IT (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação, 5µl dos fragmentos purificados foram utilizados na reação de seqüenciamento. As seqüências de DNA foram determinadas em seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems) utilizando-se 4µl de 2,5X Save Money (400mM Tris-HCl pH 9,0 , 10mM MgCl₂), 4µl de BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3,2 pmol dos oligonucleotídeos, e 4µl do DNA genômico a 5ng/µl.

As reações de seqüenciamento foram realizadas com os ciclos de temperatura programados para: 25 ciclos de 95°C por 10 seg, 50°C por 5 seg, 60°C por 4, com rampa de 1°C/seg, como recomendado pelo fabricante. Após a amplificação as amostras foram mantidas a 4°C até a precipitação. Para cada amostra foram utilizadas 2 reações, sendo uma para o primer forward e outra para o reverse. A cada reação de seqüenciamento foram adicionados 80µl de isopropanol 65%, incubando a temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 RPM por 25 min a temperatura ambiente. O isopropanol foi então removido por inversão dos tubos e, a seguir, adicionou-se 200µl de etanol 70% e centrifugou-se a 10000 RPM por 5 min a temperatura ambiente. Removeu-se todo o etanol com auxílio de micropipeta, pois qualquer etanol residual resultaria em manchas fluorescentes.

As amostras foram secas em temperatura ambiente e o DNA foi eluído em 2µl de tampão de amostra contendo Formamida Hi-Di (Applied Biosystems) + Loading Buffer (25mM EDTA pH 8,0 contendo 50mg/ml Blue Dextran) (5:1). No momento da aplicação em seqüenciador automático ABI PRISM[®] 377 (Applied Biosystems, USA) as amostras foram aquecidas a 95°C por 3 min e rapidamente transferidas para o gelo.

As seqüências de bases geradas automaticamente foram alinhadas e analisadas com auxílio do programa MEGA 5 - MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS (<http://www.megasoftware.net/>), e então comparadas com outras disponíveis no GenBank e identificadas utilizando-se o BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

PCR/RFLP (Reação em cadeia da polimerase/ Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de restrição)

Para a amplificação foram utilizados os iniciadores LINR4 e LIN19 (ARANSAY et al., 2000) gerando um fragmento amplificado de 720 pb que representa quase a totalidade do minicírculo. As reações foram realizadas em um volume de 50µl contendo 1 mM de MgCl₂, 10mM tampão Tris – HCl (pH 8.3) contendo 50mM KCl, 0,3 pmol de cada um dos iniciadores (*foward* e *reverse*), 0,1 mM de dNTPs, 1 unidade de Taq polimerase (GE Healthcare), 5µL da amostra de DNA, e água até completar o volume. As condições da reação foram: 3 min de desnaturação inicial a 94°C; trinta e três ciclos de 30s a 95°C, 30s a 58°C e 1min a 72°C; seguido de 10min de extensão final a 72°C. Posteriormente os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al. (1989). 8µl do produto amplificado pela reação de PCR foi adicionado de 2µl de tampão de amostra e aplicado em gel de agarose 1% (GIBCO BRL®) em solução de TAE 1X contendo brometo de etídio a 0,5µg/ml. Após a corrida a 90V por 40min as bandas foram visualizadas em um transluminador UV.

Antes da digestão os produtos de PCR foram precipitados da seguinte forma: adicionou-se aos produtos 100µl de etanol 95%, com incubação a temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 RPM por 25 min a temperatura ambiente. O etanol 95% foi então removido por inversão dos tubos e, a seguir, adicionou-se 200µl de etanol 70% e centrifugou-se a 10000 RPM por 5 min a temperatura ambiente.

O pellet foi ressuspensionado em 20µl de água e quantificado com o uso de espectrofotômetro Nanodrop. As leituras das quantificações variaram de 340 a 558 ng/µl de DNA, sendo que as quantidades utilizadas nas digestões foram padronizadas em 1000 ng de produto de PCR, com o intuito de garantir de que cada amostra utilizada tivesse a mesma quantidade de DNA inicial na digestão.

Os produtos foram então digeridos com as enzimas de restrição RsaI, e HpaII separadamente (Promega) sob o seguinte protocolo: em um volume final de 20µl da reação foram adicionados 12,3µl de água estéril, 2µl do tapão de reação 10X, 0,2µl de BSA acetilada (10µg/µl), 0,5µl de cada enzima de restrição (10u/µl) e 5µl do produto de PCR ressuspensionado. A reação foi colocada então em bloco aquecido a 37°C por 2 horas.

Decorrido o tempo de digestão, o volume total da reação (20µl) foi adicionado de 2µl de tampão de amostra e aplicado em gel de agarose de alta resolução Metaphor 3% (FMC BioProducts) em solução de TAE 1X contendo brometo de etídio a 0,5µg/ml. Após a corrida a 110V por 2 horas as bandas foram visualizadas em um transluminador UV.

Construção da árvore fenética

Os fragmentos gerados na digestão foram utilizados na construção de uma matriz binária (1 indica a presença de um fragmento e 0 a ausência), que foi convertida numa matriz de distância com o uso do programa RESTDIST, que por sua vez, foi utilizada na construção de um dendrograma pelo método de UPGMA com a utilização do programa NEIGHBOR (ambos os programas fazem parte do pacote de programas PHYLIP, versão 3.6, disponível em: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). A árvore fenética resultante foi construída com o programa TREEVIEW versão 1.6.

Resultados

Pela análise do sequenciamento foi possível detectar três espécies: *L. chagasi*, *L. braziliensis* e *L. major*.

Leishmania chagasi foi a única espécie identificada em 45 isolados provenientes de pacientes com leishmaniose visceral. Os casos estudados abrangeram sete municípios do Estado de Mato Grosso do Sul, com predomínio daqueles procedentes de Campo Grande (41). Os municípios de Miranda, Terenos, Ponta Porã, Sidrolândia, Aquidauana e Três Lagoas contribuíram com um caso cada.

Leishmania major e *L. braziliensis* foram detectadas em pacientes com a forma cutânea de leishmaniose.

A amplificação do kDNA para todos os isolados produziu uma banda estimada de 720pb (não mostrada). O padrão de digestão com as enzimas de restrição RsaI e HpaII, mostrou diferença no perfil de distribuição das bandas (Figura 1).

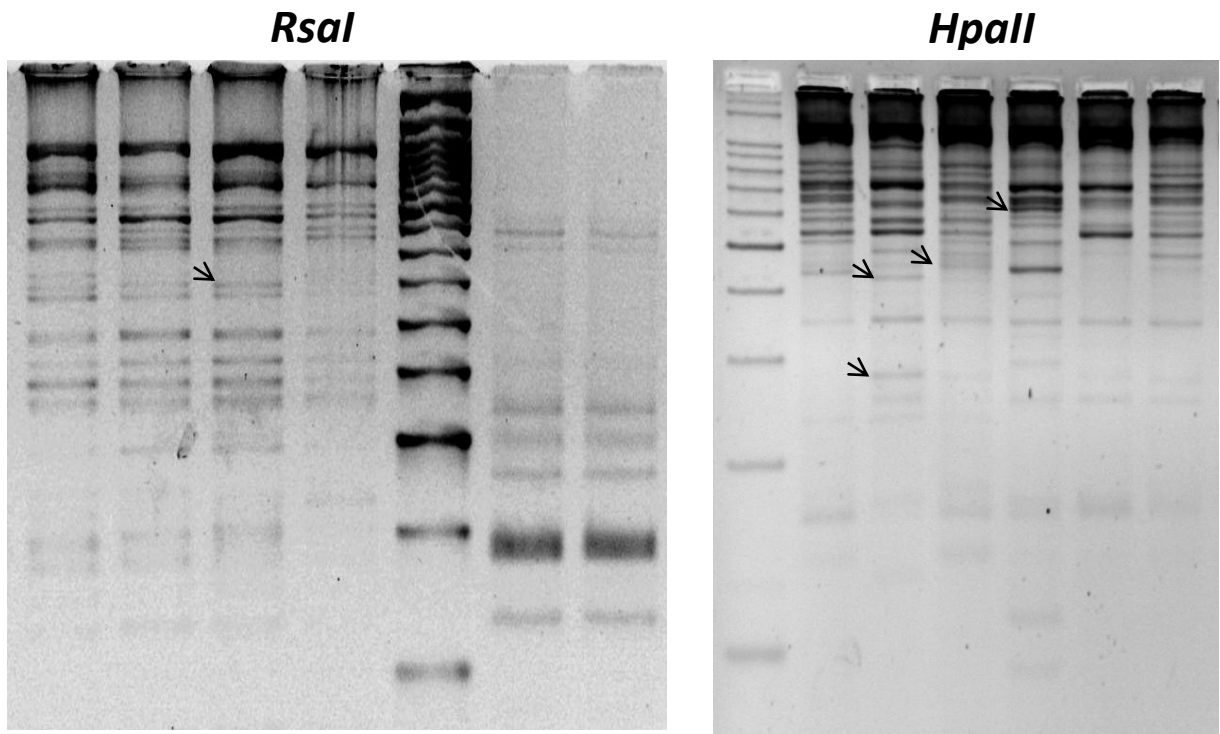


Figura 1- Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de restrição (RFLP) com as enzimas RsaI e HpaII em kDNA de *Leishmania*, gel de agarose Metaphor 3%. Perfis de bandas encontradas nas amostras estudadas. Marcador de 50pb.

A comparação das sequências obtidas com aquelas depositadas no GenBank permitiu a identificação das espécies dos isolados.

GENEBANK FJ753385.1L. *braziliensis*, Identidade = 247/247 (100%), Isolado 83:

Query1	CTTGTGTTTTCTAGCAAGCCTTTCCACAGATACGCAATACAATCTATATATGTATATAT	60
Sbjct51	CTTGTGTTTTCTAGCAAGCCTTTCCACAGATACGCAATACAATCTATATATGTATATAT	110
Query61	ATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGACGTTAACATATCGCGTATACAACAA	120
Sbjct111	ATAGACACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGACGTTAACATATCGCGTATACAACAA	170
Query121	AAAAGTTCGTTCTACGGCTTTTTTTTTGGCGGCGTGCGTGGATAACGGCTCACATAACGT	180
Sbjct171	AAAAGTTCGTTCTACGGCTTTTTTTTTGGCGGCGTGCGTGGATAACGGCTCACATAACGT	230
Query181	GTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCATAAGTG	240
Sbjct231	GTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCATAAGTG	290
Query241	GTATCAA	247
Sbjct291	GTATCAA	297

GENEBANK FN677342.1L. *major*, Identidade = 288/288 (100%), Isolado 11.

```

QUERY1      CTTATTCTATATATATATATAGTATAGGCTTTCCACATACACAGCAAACCTTTTATACT 60
            |||
SBJCT142     CTTATTCTATATATATATATAGTATAGGCTTTCCACATACACAGCAAACCTTTTATACT 201
            |||

QUERY61      CGAAATTTGCAGTAAAAAAGGCCGATCGACGTTGTAGAACGCACCGCCTATACACAAAAG 120
            |||
SBJCT202     CGAAATTTGCAGTAAAAAAGGCCGATCGACGTTGTAGAACGCACCGCCTATACACAAAAG 261
            |||

QUERY121     CAAAAATGTCCGTTTATACAAAAAATAGACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGAGGGAGAG 180
            |||
SBJCT262     CAAAAATGTCCGTTTATACAAAAAATAGACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGAGGGAGAG 321
            |||

QUERY181     AGAGGGGGGTGCGTGCGCGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGG 240
            |||
SBJCT322     AGAGGGGGGTGCGTGCGCGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGG 381
            |||

QUERY241     CTTCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCATAAGTGGTATCAA 288
            |||
SBJCT382     CTTCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCATAAGTGGTATCAA 429
            |||

```

GENEBANK HQ535858.1L. *infantum*, Identidade = 261/262 (99%), Isolado 52.

```

Query1       CTATGTATATATATGTAGGCCTTTCCACATACACAGCAAAGTTTTGTACTCAAAATTTG 60
            |||
Sbjct54      CTATGTATATATATGTAGGCCTTTCCACATACACAGCAAAGTTTTGTACTCAAAATTTG 113
            |||

Query61      CAGTAAAAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAATGTCC 120
            |||
Sbjct114     CAGTAAAAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAATGTCC 173
            |||

Query121     GTTTATACAAAAATATAC-GCGTTTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTGCGTGTGTGGATAA 179
            |||
Sbjct174     GTTTATACAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTGCGTGTGTGGATAA 233
            |||

Query180     CGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGT 239
            |||
Sbjct234     CGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGT 293
            |||

Query240     AAAGTGCATAAGTGGTATCAA 261
            |||
Sbjct294     AAAGTGCATAAGTGGTATCAA 315
            |||

```

GENEBANK HQ535858.1 L. *infantum*, Identidade = 261/262 (99%), Isolado 93.

```

Query1       CTATGTATATATATGTAGGCCTTTCCACATACACAGCAAAGTTTTGTACTCAAAATTTG 60
            |||
Sbjct54      CTATGTATATATATGTAGGCCTTTCCACATACACAGCAAAGTTTTGTACTCAAAATTTG 113
            |||

Query61      CAGTAAAAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAATGTCC120
            |||
Sbjct114     CAGTAAAAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAATGTCC 173
            |||

Query121     GTTTATACAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTGCGTGTGTGGATAA 180
            |||
Sbjct174     GTTTATACAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTGCGTGTGTGGATAA 233
            |||

Query181     CGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGT 240
            |||
Sbjct234     CGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGT 293
            |||

Query241     AAAGTGC- TAAGTGGTATCAA 261
            |||
Sbjct294     AAAGTGCATAAGTGGTATCAA 315
            |||

```

A partir da amplificação e digestão do kDNA de *Leishmania* pela PCR/RFLP, foi possível a construção de uma árvore fenética (Figura 2). A análise do dendograma evidenciou a ocorrência de 30 genótipos.

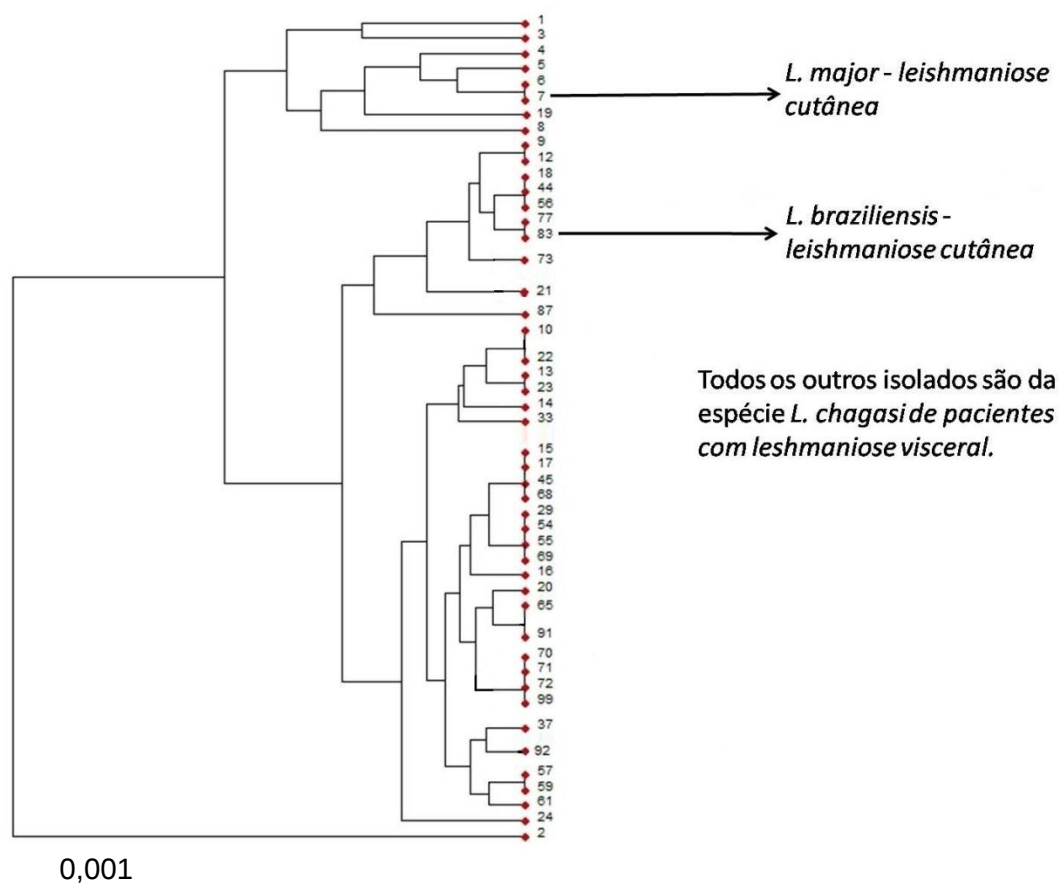


Figura 2 – Árvore fenética (UPGMA) construída a partir do resultado da RFLP do kDNA, mostrando a distribuição de 47 isolados de *Leishmania* de Mato Grosso do Sul

DISCUSSÃO

Leishmania (Leishmania) chagasi foi identificada como o único agente responsável pelos casos de leishmaniose visceral, corroborando os achados de Lima Junior et al. (2009) pela PCR padrão.

Nos casos da forma cutânea, foram identificadas as espécies: *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major*, não detectadas anteriormente (LIMA JUNIOR et al., 2009), mostrando que a identificação específica a partir do produto de uma reação de PCR/sequenciamento, confere segurança nos resultados, uma vez que as sequências obtidas são comparadas no Genbank.

Além disso, caracterizar o agente etiológico possibilita adequada conduta clínica, tendo em vista a similaridade entre os quadros clínicos, fornecendo ainda, subsídios para que medidas efetivas de prevenção e controle possam ser implementadas nas áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar.

Em Mato Grosso do Sul, *L. braziliensis* é o agente incriminado como responsável por casos humanos de LT (NUNES et al., 1995) e tem sido descrito tanto em animais domésticos como em flebotomíneos (SAVANI, 2004; PAIVA et al., 2006, 2010). Recentemente foi detectado DNA de *Leishmania braziliensis* em saliva de paciente com leishmaniose mucocutânea por meio dos *primers* b1/b2 (CORVALAN et al., 2011).

Leishmania major é pela primeira vez descrita no Brasil e foi isolada de um paciente com história de viagem a Síria, que apresentava lesão cutânea única, de aspecto vesiculoso, em antebraço direito, diagnosticado e tratado em Campo Grande, MS, porém alóctone, pois o provável local de infecção foi na área de ocorrência dessa espécie de parasito.

Embora *L. major* não pertença às espécies do Novo Mundo, esse achado assume importância, não só por evidenciar a eficácia da técnica na identificação do agente, assim como pelos relatos da ocorrência da espécie *L. major-like* no Brasil e outros países da América, cuja origem não está bem estabelecida.

Portanto, a existência de *L. major* como agente causador de leishmaniose tegumentar deve ser considerada tanto em estudos de identificação da espécie e de epidemiológica dessa parasitose no Novo Mundo.

Enquanto o sequenciamento exige laboratórios de alto custo e pessoal capacitado, a técnica da PCR/RFLP se apresenta como uma alternativa rápida e mais econômica, sem a necessidade de realizar o sequenciamento, porém, com igual segurança e eficácia (MARFUT et al., 2003a,b; VOLPINI et al., 2004), tendo se destacado por fornecer um grande poder discriminatório dos minicírculos do DNA do cinetoplasto (BOTILDE et al., 2006).

A análise dos polimorfismos nos fragmentos de restrição do kDNA é considerada um poderoso instrumento para estudos epidemiológicos e para mostrar variabilidade genética em amostras de *Leishmania* (BARKER; ARNOT, 1981; ANGELICI et al., 1989; PACHECO et al., 1999), o que corrobora com os achados de diversidade observados no presente estudo.

A variabilidade alélica pode ser explicada pelo fato das sequências do kDNA evoluírem mais rapidamente do que as do DNA nuclear, podendo mostrar um nível maior de polimorfismo intraespecífico (PACHECO et al., 1986).

A heterogeneidade de kDNA também foi evidenciada por Alonso et al. (2010) em isolados humanos, de flebotomíneos e cães da cidade de Teresina, PI, ao utilizarem a mesma metodologia, PCR/RFLP com as enzimas *RsaI* e *HpaII*, encontrando significativa diversidade genética, principalmente em amostras de culturas, material também utilizado neste estudo.

Sabe-se que os minicírculos do DNA do cinetoplasto desempenham papel fundamental no correto funcionamento genético mitocondrial, estando esse DNA, provavelmente mais envolvido com uma rápida resposta a diferentes condições ambientais e situações de estresse fisiológico. É possível que essa resposta interfira na adaptabilidade do parasito, que pode adquirir vantagens seletivas diferentes conforme a classe de minicírculos que mais prevalece dentro da rede do kDNA (ALONSO, 2011).

Pouco se conhece a respeito da variação genética nas diferentes espécies de *Leishmania*. Por esta razão, estudos que empregam métodos moleculares auxiliam o entendimento sobre a circulação de populações de *Leishmania* entre hospedeiros e vetores em cada foco de transmissão, o que constitui fator de importância epidemiológica, pois diferentes genótipos parasitários podem estar associados a diferentes manifestações clínicas (BERZUNZA-CRUZ et al., 2000; TIBAYRENC, 1999).

Assim, a elevada heterogeneidade de kDNA, tanto intra como interespecífica observada nos isolados humanos de *Leishmania chagasi* de Mato Grosso do Sul, pode justificar a diferença no perfil clínico da leishmaniose visceral, em comparação ao de outras áreas endêmicas da parasitose, uma vez que no Estado, os pacientes se apresentam com expressiva esplenomegalia e pancitopenia, em poucos dias de evolução, diferente do padrão habitual da doença, de evolução lenta e de longa duração (BRUSTOLONI, 2006).

Deve-se mencionar também o encontro de espécimes de *Lu. longipalpis*, habitualmente vetor de *L. chagasi*, infectados com *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, que além de destacar a permissividade dessa espécie (Paiva et al., 2006, 2010; SAVANI et al., 2009), permite sugerir uma possível variabilidade genética tanto do vetor quanto do parasito

Considerando, portanto, que os fatores que influenciam a diversidade clínica nas leishmanioses, não estão inteiramente elucidados, admite-se que as variações genéticas do hospedeiro, parasito e possivelmente, vetores sejam importantes neste contexto.

Assim, a identificação das espécies de *Leishmania*, o diagnóstico molecular e o estudo da variabilidade genética, que constituíram a proposta do presente trabalho, forneceram resultados potencialmente favoráveis a um melhor entendimento da epidemiologia molecular das leishmanioses, ampliando os conhecimentos sobre a dinâmica epidemiológica dessas parasitoses no Estado, além de diagnóstico e conduta clínica dos pacientes e, no futuro, contribuir para o desenvolvimento de uma vacina específica para a realidade regional.

REFERÊNCIAS

ALONSO, D. P. **Utilização de Marcadores Moleculares no Estudo Populacional de *Leishmania infantum chagasi*** no Brasil, 2011. 37 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu Botucatu 2011.

ALONSO, D. P.; COSTA, D. L.; DE MENDONÇA, I. L., COSTA, C. H.; RIBOLLA, P. E., Heterogeneity of *Leishmania infantum chagasi* Kinetoplast DNA in Teresina (Brazil), **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n.5, p. 819–82, Mai. 2010.

ANGELICI, M.C.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. Study on genetic polymorphism o *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns o kinetoplast DNA. **Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 301-309, Dez. 1989.

BARKER, D. C.; ARNOT, D. E. Biochemical identification of cutaneous *Leishmania* by analysis of kinetoplast DNA. I. Ultrastructural and buoyant density analysis. **Molecular and biochemical parasitology**, v.3, n.1, p. 33-46, Abr. 1981.

BARKER, D.C., BUTCHER, J. The use of DNA probes in the identification of leishmanias: discrimination between isolates of *Leishmania mexicana* and *Leishmania braziliensis* complexes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.77, p.285-297, 1983.

BERZUNZA-CRUZ, M., B.; BRICAIRE, G.; ROMERO, Z.; BECKER, R., P.; LIRA, E., S.; MONTFORT, R., P.; ROSSI, M., C.; CASTREJON, O., V.; BECKER, I. *Leishmania mexicana mexicana*: genetic heterogeneity of mexican isolates revealed by restriction lenght polymorphism analysis of kinetoplast DNA. **Experimental Parasitology**, v. 95, n. 4 p. 277-284, Aug. 2000.

BOTILDE, Y.; LAURENT, T., TINTAYA, W. Q.; CHICHARRO, C.; CAÑAVATE, C.; CRUZ, I.; KUHL, K.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J.C. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*, Infection. **Genetics and Evolution**, v. 6, n. 6, p. 440–446, Nov. 2006.

BRUSTOLONI, Y. M. **Leishmaniose visceral em crianças no estado de mato grosso do sul, brasil: contribuição ao diagnóstico e ao tratamento**. 2006. 31 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Convênio Rede Centro-Oeste UnB / UFG / UFMS Campo Grande 2006.

CORTES, S.; MAURICIO, I.; ALMEIDA, A.; CRISTOVÃO, J.M.; PRATLONG, F.; DEDETE, J. P.; CAMPINO, L. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. **Parasitology International**, v. 55, n. 4, p. 277-283, Dec. 2006.

CORVALAN, F. H., SAMPAIO, R. N. R., BRUSTOLONI, Y.M., ANDREOTTI, R., LIMA JÚNIOR, M. S. C. DNA identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. 98-102, Dez. 2011.

LIMA JUNIOR, M. S. C.; ANDREOTTI, R.; DORVAL, M. E. M. C.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. G.; MATOS, M. DE F. C. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 303-307, Mai./Jun. 2009.

MARFURT, J.; NASEREDDIN, A.; NIEDERWIESER, I.; JAFFE, C. L.; BECK, H.P.; FELGER, I. 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, Jul. 2003a.

MARFURT, J.; NIEDERWIESER, I.; MAKIA, N. D.; BECK, H.; FELGER, I. Diagnostic genotyping of old and new world *Leishmania* species by PCR-RFLP. **Diagnostic microbiology and infectious disease**. v. 46, n. 2, p. 115-124, Jun. 2003b.

NASEREDDIN, A.; AZMI, K.; JAFFE, C. L.; EREQAT, S.; AMRO, A., SAWALHAH, S.; BANETH, G.; SCHÖNIAN, G.; ABDEEN, Z. Kinetoplast DNA heterogeneity among *Leishmania infantum* strains in central Israel and Palestine. **Parasitology veterinary**, v. 161, n. 1-2, p. 126-130, Abr. 2009.

NUNES, V. L. B.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; NOGUCHI, R. C.; ARÃO, L. B.; HANS FILHO, G.; ESPÍNDOLA, M. A.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; SERAFINE, L. N., SANTOS D. Estudo epidemiológico sobre Leishmaniose Tegumentar (LT) no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul - estudos na população humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, n. 3, p. 185-193, Jul./Sep.1995.

PACHECO, R. S.; BRITO, C. M. Reflections on the population dynamics of *Trypanosoma cruzi*: heterogeneity versus plasticity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, S/1, v. 1, p.199-201, 1999.

PACHECO, R. S.; LOPES, U. G.; MOREL, C. M.; GRIMALDI, J. R. G.; MOMEM, H. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. In: *Leishmania* Taxonomy et Phylogenese. **Applications Eco-epidemiologiques**. Rioux, J. A. ed., p. 57-65, 1986.

PAIVA, B. R.; OLIVEIRA, A. G.; DORVAL, M. E. M. C; GALATI, E. A. B.; MALAFRONT, R. S. Species - specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 126-130, Jul./Aug., 2010.

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F. C.; NASCIMENTO, J. C.; PIMENTA, P.F.P.; GALATI, E.A.B.; ANDRADE JUNIOR, H.F.; MALAFRONT, R.S. Detection and identification of *Leishmania* especies in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica**, v. 99, n. 2-3, p. 252–259, Oct. 2006.

SAVANI, E. S. M. M.; NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; CASTILHO, T. M., ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 18–24, Mar. 2009.

SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H. D. F. H.; PRESBER, W.; JAFFE, C. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 47, n. 1, p. 349-358, Sep. 2003.

Secretaria de Estado de Saúde, **Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN)** Campo Grande, MS, 2011.

TIBAYRENC, M. Beyond strain typing and molecular epidemiology: Integrated genetic epidemiology of infectious diseases. **Parasitology Today**, v. 14, n. 8, p. 323- 329, Aug. 1999.

VOLPINI, A., C.; PASSOS, V., M., A.; OLIVEIRA, G., C.; ROMANHA, A., J. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and L. (*Leishmania*) *amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1, p. 31-37, 2004.

6.0 DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul constitui um importante motivo de preocupação para a saúde pública e encontra-se em franco processo de expansão, ocorrendo em 56 de seus 78 municípios, com crescente aumento no número de casos, e a confirmação de 2241 casos durante o período de 1999 a agosto de 2010 (SINAM, 2011).

A leishmaniose tegumentar é endêmica no Estado, com registro de casos desde 1975, atingindo o homem quando este entra em contato com o foco natural da parasitose, demonstrando, até o momento, um padrão de transmissão de caráter ocupacional (NUNES, 2001; DORVAL, 2006).

A identificação das espécies de *Leishmania* que circulam em determinado foco de transmissão, particularmente em regiões onde as diferentes formas clínicas ocorrem simultaneamente, é muito importante para o conhecimento da epidemiologia das leishmanioses e planejamento de estratégias de controle (BAÑULS et al., 2007).

Embora a presença de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* já tenha sido constatada na população humana (OLIVEIRA et al., 2006; DORVAL et al., 2006; NUNES et al., 1995), canina (CORTADA et al., 2004; SAVANI et al., 2009) e em flebotomíneos (PAIVA et al., 2010; SAVANI et al., 2009; SILVA et al., 2008) do Estado, ainda são escassos os estudos sobre a identificação específica dos parasitos responsáveis pela ocorrência das leishmanioses.

Assim, o trabalho **“Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase”** vem contribuir para ampliar o conhecimento das espécies responsáveis pelas diferentes formas clínicas de leishmaniose que ocorrem no Estado.

A maior contribuição do trabalho foi a confirmação de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*, como o agente detectado nos casos de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul, além de possibilitar a implantação da PCR para no futuro permitir a identificação molecular das espécies que ocorrem em diferentes hospedeiros de *Leishmania* no Estado, abrindo ainda a perspectiva de utilização

desta técnica no diagnóstico individual das leishmanioses, possibilitando adequada conduta clínica e terapêutica dos pacientes.

Leishmania (Leishmania) amazonensis foi identificada em um paciente com a forma cutânea de leishmaniose tegumentar, com local de infecção em um município do interior do Estado. Essa espécie já foi encontrada em outros casos humanos da parasitose (DORVAL et al., 2006), além de já ter sido observada em felinos (SOUZA et al., 2005; 2009), cães (SAVANI et al., 2009), e flebotomíneos (SAVANI et al., 2009, SILVA et al., 2008) demonstrando que sua circulação e distribuição geográfica, podem ser mais amplas do que se supõe, considerando que os casos são procedentes de diferentes regiões do Estado.

Assim, foi possível a identificação de duas espécies de *Leishmania*, por meio dos iniciadores RV1/RV2 e a1/a2 corroborando citações da literatura quanto à utilização desses iniciadores na caracterização específica de *Leishmania* em sangue e urina de humanos (FERROGLIO et al., 2006; LACHAUD et al., 2002; MOTAZEDIAN et al., 2008; SILVA et al., 2004), cães (GOMES et al., 2007; FERROGLIO et al., 2006) e flebotomíneos (SILVA et al., 2008).

Além da identificação específica de *Leishmania*, a reação de polimerase em cadeia (PCR) apresenta alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de LV humana e canina (REALE et al., 1999; FICHOUX et al., 1999; MIJAK et al., 2009). Um dos principais alvos é o DNA do cinetoplasto ou kDNA, uma região conservada entre as espécies de *Leishmania*, e por apresentar várias cópias, aumenta a sensibilidade do teste (BARKER, 1989; CORTES et al., 2004; 2006; DEGRAVE et al., 1994).

Tendo em vista que em Mato Grosso do Sul, a LV persiste como um importante problema de saúde pública, encontrando-se em franco processo de expansão, e sabendo das dificuldades e limitações do diagnóstico por exames parasitológicos, justifica-se a utilização de uma técnica que seja capaz de diagnosticar com alta sensibilidade, monitorar a terapia e prevenir recidivas, com perspectivas mais amplas para o manejo clínico do paciente e controle da doença.

Em vista disso, o artigo **“A comparative analysis of methods for diagnosing visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil”**, teve por objetivos avaliar a efetividade da PCR e *real time* PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana em amostras de sangue periférico, e realizar um estudo comparativo desses métodos com técnicas parasitológicas convencionais: pesquisa do parasito em aspirado medular e mielocultura.

O estudo incluiu 100 amostras de pacientes humanos com suspeita clínica de LV atendidos em um hospital de referência em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

A PCR em sangue periférico mostrou-se mais efetiva do que os métodos convencionais analisados, corroborando também as vantagens desta técnica usando os iniciadores RV1/RV2 para o diagnóstico da leishmaniose visceral. (PIARROUX et al., 1994; LACHAUD et al., 2000).

A sensibilidade da PCR padrão varia de 91% a 95%, com especificidade de 100% quando a amostra utilizada é o sangue periférico (SALOTRA et al., 2001; DISCH et al., 2003, LACHAUD et al., 2001), e apesar de se ter como alvo o kDNA, o que aumenta a sensibilidade da técnica, alguns inibidores podem diminuir a performance da reação: a técnica de extração (LACHAUD et al., 2001), a variabilidade genética (BASTIEN et al., 2008), além da degradação do DNA, e em particular do kDNA, que degrada mais rápido do que o DNA nuclear (PRINA et al., 2007).

Usando esses mesmos iniciadores, Lachaud et al. (2002) obtiveram 100% de positividade em sangue periférico de cães, diferença que pode ser devido à ocorrência de diferentes níveis de parasitemia entre humanos e cães.

Os iniciadores RV1/RV2 apresentam capacidade de detecção de menos de um parasito por amostra e não amplificam *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, agentes de diferentes formas clínicas de leishmaniose e presentes em várias regiões do Brasil (GOMES et al., 2007).

Recentemente, a PCR apresentou um significativo avanço em sua tecnologia: a *real time* PCR, com as vantagens de ser mais rápida, não necessitar de eletroforese, assim como reduzir a chance de contaminação, pois detecta a amplificação sem a abertura do tubo (CASTILHO et al., 2008) e apresentar limite de resolução similar a PCR (TUPPERWAR et al., 2008). Por estas razões a PCR - TR foi escolhida para a análise comparativa com as demais técnicas no presente estudo.

A sensibilidade dessa variante da PCR foi de 0,001 parasitos por reação com o sistema *Taqman* em amostras de humanos (MARY et al., 2004) e foi maior quando da utilização do DNA de cinetoplasto, combinado com a sonda *TaqMan* (BRETAGNE et al., 2001; NICOLAS et al., 2002; BOSSOLASCO et al., 2003; SCHULZ et al., 2003; SVOBODOVA et al., 2003; VITALE et al., 2004).

Além da utilização da *real time* PCR na detecção de *Leishmania* (CASTILHO et al., 2008; MARTÍN-EZQUERRA et al., 2009), ela é útil para a quantificação da carga parasitária, com eficiência em ambas situações (MARY et al., 2004; SCHULZ et al., 2003).

Embora a demonstração do parasito seja um teste confirmatório no diagnóstico das leishmanioses, os resultados encontrados sugerem que PCR e qPCR em sangue periférico de pacientes com suspeita clínica de LV, são técnicas adicionais importantes para o diagnóstico da parasitose. Além disso, a utilização de sangue periférico constitui um método menos invasivo do que o aspirado de medula óssea, expondo os pacientes a um menor risco e facilitando a coleta das amostras em áreas endêmicas, especialmente em casos onde há suspeita clínica da doença e os resultados dos exames parasitológicos convencionais são negativos (OSMAN et al., 1997).

Nas instituições de saúde de Mato Grosso do Sul, somente o exame direto em aspirado medular, mielocultura e métodos sorológicos estão disponíveis para o diagnóstico da LV, e ainda assim, com sérias limitações, tendo em vista que são poucos os profissionais qualificados para a pesquisa parasitológica e não existe infraestrutura para a realização da cultura, devendo-se ressaltar as dificuldades de manutenção das mesmas e ainda, o tempo de crescimento que pode durar até 30 dias (RODRIGUEZ et al., 1994). A baixa sensibilidade desta técnica tem restringido sua utilização e incentivado a busca de novas alternativas para melhorar seu desempenho (ALLAHVERDIYEV et al., 2005).

Como observado por Brustoloni et al. (2007) a cultura de aspirado medular, não é a técnica mais apropriada para o diagnóstico de LV, considerando a urgência para a decisão do tratamento. Isto pode ser evidenciado neste trabalho, uma vez que dois pacientes apresentaram como único exame positivo a PCR, reforçando a utilização desta e dos iniciadores RV1/RV2 no diagnóstico da LV, assim como já constatado por outros autores (PIARROUX et al., 1994, LACHAUD et al., 2000).

Aliado a isso menciona-se a baixa disponibilidade dos *kits* para a execução do teste rápido que só são encaminhados pelos órgãos competentes para quatro dos 56 municípios com casos da doença no Estado.

Este estudo contribui para a discussão de quais métodos deveriam estar disponíveis na rotina de diagnóstico da LV em áreas endêmicas, constituindo-se em um estudo preliminar do uso da qPCR, o qual pode ser complementado com futuras

investigações utilizando um número maior de amostras (possivelmente incluindo outras áreas endêmicas) e comparando PCR e qPCR com métodos sorológicos, particularmente os testes rápidos.

Considerando o amplo espectro das manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com suspeita de LV, o diagnóstico precoce é importante para a redução da morbimortalidade nessa parasitose, justificando-se a utilização dos métodos moleculares, com destaque para a *real time* PCR, devido a sua eficácia também no diagnóstico dos casos em que há reduzido número de parasitos e daqueles nos quais impõem-se o diagnóstico diferencial com outras patologias.

Assim, os resultados obtidos permitem inferir que as técnicas moleculares mostram-se mais efetivas que os métodos parasitológicos convencionais, tendo ainda o benefício de serem capazes de identificar os agentes etiológicos e verificar diversidade genética intra e interespecífica.

A possibilidade de implantação da *real time* PCR no diagnóstico de LV em áreas endêmicas irá favorecer o diagnóstico precoce da doença possibilitando adequado manejo clínico e terapêutico.

Sabendo-se que Mato Grosso do Sul é área endêmica para leishmaniose tegumentar, chamou a atenção a não identificação de *L. braziliensis* pela PCR (LIMA JUNIOR, 2009), uma vez que essa espécie já havia sido descrita tanto em humanos (NUNES et al., 1995) como em cães (SAVANI) e flebotomíneos do Estado (PAIVA et al., 2010).

Como até o presente, nenhum estudo avaliou a diversidade genética de espécies de *Leishmania* de casos humanos que ocorrem em Mato Grosso do Sul, o artigo **“Diversidade genética de kDNA de *Leishmania* no estado de Mato Grosso do Sul”** constitui um estudo pioneiro e teve por objetivos a identificação de possíveis espécies não evidenciadas pela PCR padrão, por meio do sequenciamento da região ITS1 de *Leishmania* e a detecção de variabilidade genética utilizando a PCR/RFLP.

Dentre 47 isolados de *Leishmania* provenientes de pacientes do Mato Grosso do Sul analisados por PCR/sequenciamento, dois eram de portadores de leishmaniose cutânea e 45 apresentavam a forma visceral.

Neste estudo, a maioria das amostras foi de mielocultura o que pode ser justificado pelo franco processo de expansão da leishmaniose visceral no Estado e ao fato da leishmaniose tegumentar ser, na maioria dos casos, diagnosticada nos

municípios de origem dos pacientes, não chegando à capital, Campo Grande que é centro de referência para o diagnóstico dessas parasitoses (LIMA JUNIOR et al., 2009).

Leishmania (Leishmania) chagasi foi identificada como o único agente responsável pelos casos de leishmaniose visceral, corroborando os achados de Lima Junior et al. (2009) pela PCR padrão.

Nos casos da forma cutânea, foram identificadas as espécies: *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major*, não detectadas anteriormente, mostrando que a identificação específica a partir do produto de uma reação de PCR/sequenciamento, confere segurança nos resultados, uma vez que as sequências obtidas são comparadas no Genbank. Além disso, caracterizar o agente etiológico possibilita adequada conduta clínica, tendo em vista a similaridade entre os quadros clínicos, e fornece ainda, subsídios para que medidas efetivas de prevenção e controle possam ser implementadas nas áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar.

Apesar de várias espécies de *Leishmania* estarem envolvidas na manutenção da leishmaniose tegumentar americana no País, *Leishmania braziliensis* é a espécie predominante como agente etiológico (MARTINS et al., 2010). Também em Mato Grosso do Sul é o agente incriminado como responsável por casos humanos de LT (NUNES et al., 1995) e tem sido descrita tanto em animais domésticos como em flebotomíneos (SAVANI, 2004; PAIVA et al., 2006, 2010). Recentemente foi detectado DNA de *Leishmania braziliensis* em saliva de paciente com leishmaniose mucocutânea por meio dos *primers* b1/b2 (CORVALAN et al., 2011).

Leishmania major é, pela primeira vez, descrita no Brasil e foi isolada de um paciente com história de viagem a Síria, que apresentava lesão cutânea única, de aspecto vesiculoso, em antebraço direito, diagnosticado e tratado em Campo Grande, MS, porém alóctone, pois o provável local de infecção foi na área de ocorrência dessa espécie de parasito.

Embora *L. major* não pertença às espécies do Novo Mundo, esse achado assume importância, não só por evidenciar a eficácia da técnica na identificação do agente, assim como pelos relatos da ocorrência da espécie *L. major-like* no Brasil (SILVA et al., 2008) e outros países da América, cuja origem não está bem estabelecida.

No Velho Mundo, *L. major* destaca-se entre as principais espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea. O hospedeiro reservatório primário é

Rhombomys opimus, abundante na região e o principal vetor, *Phlebotomus papatasi*. Tem sido estudada principalmente na região central da Ásia e norte da África, onde é comumente responsável pelos casos de leishmaniose mucocutânea (NEOUIMINE, 1996).

A introdução de *L. major* no Brasil, assim como para *L. infatum*, é atribuída a determinados fatores, como por exemplo, a colonização pelos europeus, a vinda de escravos africanos acompanhados de seus cães e ainda, a chegada de imigrantes ou roedores do Velho Mundo (MOMEN et al., 1985), sendo este um fator real que poderia ser considerado como causa da origem de amostras similares a *L. major* no continente americano. O parasito teria se adaptado aos vetores e hospedeiros existentes, estabelecendo assim, um ciclo de transmissão (GRIMLADI et al., 1989, YAMASAKI et al., 1994, MOMEN et al., 1985, DEANE; GRIMALDI, 1985; HASHIGUCHI et al., 1991), embora segundo Shaw (2003), os vetores e hospedeiros dessa espécie no Brasil ainda permaneçam indeterminados.

Portanto, a existência de *L. major* como agente causador de leishmaniose tegumentar deve ser considerada tanto em estudos de identificação específica como aqueles de natureza epidemiológica da leishmaniose tegumentar no Novo Mundo.

Pouco se conhece a respeito da variação genética das diferentes espécies de *Leishmania*. Por esta razão, estudos que empregam métodos moleculares auxiliam o entendimento sobre a circulação de populações de *Leishmania* entre hospedeiros e vetores em determinada área geográfica. Isto constitui fator de importância epidemiológica, pois diferentes fenótipos parasitários podem estar associados a diferentes manifestações clínicas (TIBAYRENC, 1999).

Enquanto o sequenciamento exige laboratórios de alto custo e pessoal capacitado, a técnica da PCR/RFLP se apresenta como uma alternativa rápida e mais econômica, sem a necessidade de realizar o sequenciamento, porém, com igual segurança e eficácia (MARFUT et al., 2003a,b; VOLPINI et al., 2004), tendo se destacado por fornecer um grande poder discriminatório dos minicírculos do DNA do cinetoplasto (BOTILDE et al., 2006).

Em um estudo utilizando 25 linhagens de *Leishmania infantum* obtidas de humanos e cães em três focos de transmissão de LV na Espanha, essa técnica apresentou maior poder discriminatório mostrando 21 padrões diferentes para as 25 linhagens testadas, com apenas uma enzima de restrição (*RsaI*) (BOTILDE et al., 2006), que no presente trabalho foi utilizada em associação com a *HpaII*.

Berzunza-Cruz et al. (2000) utilizaram a técnica de RFLP em amostras purificadas do kDNA de isolados de *Leishmania* e obtiveram padrões de restrição relacionados com o comportamento clínico.

Devido à diversidade genética do kDNA e às diferentes manifestações clínicas relacionadas às espécies encontradas, sugere-se que o genoma mitocondrial, no caso o genoma do cinetoplasto, seja responsável pela heterogeneidade genética, uma vez que a variabilidade genômica nuclear das diversas espécies de *Leishmania* é significativamente baixa (LYNN; MCMASTER, 2008).

Outro aspecto de relevância é que a presença ou ausência de sequências específicas de 4 a 8 pares de bases, reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, podem variar entre diferentes indivíduos gerando polimorfismos (HIDE et al., 2001; MAURÍCIO et al., 2001; ZEMANOVÁ et al., 2004).

Entre os mecanismos de geração de variabilidade genética destacam-se as inserções, deleções ou outros rearranjos (translocações, inversões) que alteram a distância entre pares de sítios de restrição (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Estes mecanismos explicam também a variabilidade observada no kDNA de tripanossomatídeos e resultam na produção de uma variedade de moléculas ou classes de minicírculos distintas (FERNANDES et al., 1999).

Assim, a identificação das espécies de *Leishmania*, o diagnóstico molecular e o estudo da variabilidade genética, que constituíram os objetivos do presente trabalho, forneceram resultados potencialmente favoráveis para a implantação do diagnóstico de LV pela *real time* PCR em amostras de sangue periférico, método menos invasivo para a obtenção do material biológico, sendo útil no diagnóstico precoce da doença em áreas endêmicas, possibilitando adequada conduta clínica e terapêutica dos pacientes.

Além disso, gerou subsídios para estudos de epidemiologia molecular das leishmanioses em Mato Grosso do Sul, ampliando os conhecimentos sobre a dinâmica dessas parasitoses, e no futuro, podendo contribuir para o desenvolvimento de uma vacina específica de acordo com a realidade regional.

7.0 CONCLUSÕES

Os iniciadores RV1/RV2 e a1/a2 foram capazes de identificar, respectivamente, as espécies *Leishmania (Leishmania) chagasi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, definindo a etiologia dos casos de leishmaniose visceral e tegumentar a partir de isolados de casos humanos de Mato Grosso do Sul. Nas amostras analisadas não foi detectada a presença de *Leishmania braziliensis*.

A PCR em tempo real mostrou ser uma alternativa para o diagnóstico da leishmaniose visceral no estado do Mato Grosso do Sul, pois além do alto poder de detecção em relação aos métodos parasitológicos convencionais, permite um procedimento menos invasivo para a obtenção de material biológico e o diagnóstico precoce, importante para reduzir a morbimortalidade nessa parasitose.

Pelo sequenciamento da região ITS1 de isolados de casos humanos de leishmaniose, foram identificadas as espécies *Leishmania braziliensis*, *Leishmania chagasi* e *Leishmania major*. Este é o primeiro relato de *L. major* no Brasil, devendo-se atentar para a presença dessa espécie no Novo Mundo, tanto em estudos de identificação específica como aqueles de natureza epidemiológica sobre leishmaniose tegumentar.

A técnica da PCR/RFLP detectou ampla variabilidade genética no kDNA dos isolados humanos de *Leishmania*. É possível que essa elevada heterogeneidade intraespecífica observada nos isolados humanos de *Leishmania chagasi* de Mato Grosso do Sul, justifique a diferença no perfil clínico da leishmaniose visceral, em comparação ao de outras áreas endêmicas da parasitose.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, J. E., Leishmaniose Visceral no Brasil. **Revista de Medicina da Universidade Federal do Ceará**, v. 17/18, p. 129-148. 1977.
- ALLAHVERDIYEV, D. M.; BAGIROVA, M.; UZUN, S.; ALABAZ, D.; AKSARAY, N.; KOCABAS, E.; KOKSAL, F. The Value of a New Microculture Method for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis by Using Bone Marrow and Peripheral Blood. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 276-280, Ago. 2005.
- ALTAMIRANO-ENCISO, A. J.; MARZOCHI, M. C. A.; MOREIRA, J. S.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História Ciências Saúde-Manguinhos**, v.10, n. 3, p. 853-882, Set-dez. 2003.
- ALVAR, J.; APARICIO, P.; ASEFFA, A.; DEN BOER, M.; CAÑAVATE, C.; DEDET, J.P.; GRADONI, L.; TER HORST, R.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MORENO, J., The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 2, p. 334-359. Abril. 2008.
- ALVAREZ, A. M. M. **Leishmaniasis: Aspectos de interés sobre un parasitismo exótico para Cuba**. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, v. 48, n. 1, p. 78-92, Abr. 2010.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 1993-1997, Jan./feb., 2004.
- ALONSO, D. P.; COSTA, D. L.; DE MENDONÇA, I. L.; COSTA, C. H.; RIBOLLA, P. E., Heterogeneity of *Leishmania infantum chagasi* Kinetoplast DNA in Teresina (Brazil), **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 5, p. 819–82, Mai. 2010.
- ANGELICI, M.C.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. Study on genetic polymorphism of *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. **Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 301-309, Dez. 1989.
- ANTINORI, S.; CALATTINI, S.; LONGHI, E.; BESTETTI, G.; PIOLINI, R.; MAGNI, C.; ORLANDO, G.; GRAMICCIA, M.; ACQUAVIVA, V.; FOSCHI, A.; CORVASCE, S.; COLOMBA, C.; TITONE, L.; PARRAVICINI, C.; CASCIO, A.; CORBELLINO, M. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 11, p. 1602–1610, Jun. 2007.
- ARANSAY, A. M.; SCOULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by semi-nested PCR on

minicircle kinetoplastic DNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1933–1938, Mai. 2000.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, Nov. 2000.

AWASTHI, A., MATHUR, R.K., SAHA, B., Immune response to *Leishmania* infection. **The Journal of research in Indian medicine**, v. 119, n. 6, p. 238-258, Jun. 2004.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and cat. 3.ed. **Philadelphia: Elsevier**, p. 685-698, 2006.

BAÑULS, A.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**, v. 64, p.1-109, Mai. 2007.

BARKER, D.C. Kinetoplast minicircle sequence database. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/parasites/kDNA/Source.htm>. Acesso em: mar 2011.

BARKER, D.C. Molecular approaches to DNA diagnosis. **Parasitology**, v. 99: Suppl: S1, p. 125–146, 1989.

BARKER, D. C.; ARNOT, D. E. Biochemical identification of cutaneous *leishmanias* by analysis of kinetoplast DNA. I. Ultrastructural and buoyant density analysis. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 3, n. 1, p. 33-46, Abr. 1981.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRA, D. F.; ANDRADE FILHO, F. A.; TRIGO, J.; JULIAO, F. S.; FRANKE, C. R.; PALIS AGUIAR, P. H.; CONRADO DOSSANTOS, W. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Veterinary Journal**, v. 171, n. 2, p. 331-9, Mar. 2006a.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRA, D. F.; SANTOS, S. O.; CHAGASJUNIOR, A. D.; PAIXAO, M.; AGUIAR, P. H.; DOS-SANTOS, W. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniosis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 111, n. 3-4, p. 251-61, Jun. 2006b.

BASTIEN, P.; PROCOP, G. W.; REISCHL, U. Quantitative Real-Time PCR Is Not More Sensitive than “Conventional” PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1897–1900, Jun. 2008.

BERZUNZA-CRUZ, M., B.; BRICAIRE, G.; ROMERO, Z.; BECKER, R., P.; LIRA, E., S.; MONTFORT, R., P.; ROSSI, M., C.; CASTREJON, O., V.; BECKER, I. *Leishmania mexicana mexicana*: genetic heterogeneity of mexican isolates revealed by restriction length polymorphism analysis of kinetoplast DNA. **Experimental Parasitology**, v. 95, n. 4, p. 277-284, Aug. 2000.

BOGGINO, J.; MASS, L. Primer caso ciertamente autóctono de leishmaniosis visceral. **Anales de la facultad de Ciencias Medicas**, Universidad Nacional de Asunción. v. 5, p. 319-324, 1945.

BOSSOLASCO, S.; GAIERA, G.; OLCINI, D.; GULLETTA, M.; MARTELLO, L.; BESTETTI, A.; BOSSI, L.; GERMAGNOLI, L.; LAZZARIN, A.; UBERTI-OPPA, C.; CINQUE, P. Real-Time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5080–5084. Nov. 2003.

BOTELHO, A. C. A.; NATAL, D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 503-508, Set./out. 2009.

BOTILDE, Y.; LAURENT, T.; TINTAYA, W. Q.; CHICHARRO, C.; CAÑAVATE, C.; CRUZ, I.; KUHLS, K.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J.C. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*, Infection. **Genetics and Evolution**, v. 6, n. 6, p. 440–446, Nov. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. – Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006.

BRAZ, R. F.; NASCIMENTO, E. T.; MARTINS, D.R.; WILSON, M.E.; PEARSON, R.D.; REED, S. G.; JERONIMO, S. M. The sensivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 4, p. 344-348. Out. 2002.

BRETAGNE, S.; DURAND, R.; OLIVI, M.; GARIN, J.; SULAHIAN, A.; RIVOLLET, D.; VIDAUD, M.; DENIAU, M. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 4, p. 828–831. Jul. 2001.

BROWN, T. A. Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução. Porto Alegre: Artmed, 2003.

BRUSTOLONI, Y. M.; CUNHA, R. V.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; PONTES, E. R. J. C.; OLIVEIRA, A. L. L.; HILLEBRAND, L.; RIBEIRO, L. F., Comparison of Conventional Methods for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Children of the Center-West Region of Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.11, n. 1, p.106-109, Fev. 2007.

CARVALHO, C. A.; BORBOREMA, S. E. T., HIRAMOTO, R. M.; MEIRELES, L. R.; ANDRADE, J. R. H. Influência da dissociação de imunocomplexos na sorologia da leishmaniose visceral em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, provenientes de áreas endêmicas do estado de São Paulo. **VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, SP. 2010.

CASTILHO, T. M.; CAMARGO, L. M. A.; MCMAHON-PRATT, D.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. A. Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Identification and Quantification of American *Leishmania* Species on the Basis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 1, p.122–132, Jan. 2008.

CHANG, K. P. *Leishmania donovani*: Promastigote - macrophage surface interactions in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 48, p. 175-189. 197. 1979.

CHAPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J. BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p. S7-S16, 2007.

CHOCHOLOVÁ, E.; JIRKŮ, M.; LUKES, J. A diagnostic assay based on variable intergenic region distinguishes between *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*. **Folia Parasitologica**, v. 55, n. 1, p. 75-78, Mar. 2008.

CORTADA, V.C.M.L.; DORVAL, M.E.C.; SOUZA-LIMA, M.A.A.; OSHIRO, E.T.; MENEZES, C.R.V.; ABREUSILVA, A.L.; CUPOLILO, E.; SOUSA, C.S.F.; CARDOSO, F.O.; ZAVERUCHA-DO-VALE, T.; BRAZIL, R.P.; CALABERSE, K.S.; GONÇALVES-DA-COSTA, S.C. Canine visceral leishmaniosis in Anastácio, Mato Grosso do Sul State Brazil. **Veterinary Research**, v. 28, n. 5, p. 365-474, Jul. 2004.

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 12-17, Jan. 2004.

CORTES, S.; MAURICIO, I.; ALMEIDA, A.; CRISTOVÃO, J.M.; PRATLONG, F.; DEDETE, J. P.; CAMPINO, L. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. **Parasitology International**, v. 55, n. 4, p. 277-283, Dec. 2006.

CORVALAN, F. H., SAMPAIO, R. N. R., BRUSTOLONI, Y.M., ANDREOTTI, R., LIMA JÚNIOR, M. S. C. DNA identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. 98-102, Dez. 2011.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 223-228, mar/abr. 2001.

CRUZ, A. K.; TOSI, L. R. Molecular Biology. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 4, p. 533-540, Dez. 1996.

DEANE, L. M.; GRIMALDI, G. Leishmaniasis in Brazil In: KP Chang, RS Bray (eds), **Leishmaniasis**, Elsevier, Amsterdam. p. 247-281, 1985.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPEBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 463–469, Jul./Set 1994.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Organization Statistics Quarterly**, v. 45, n. 2-3, p. 267-275. 1992.

DISCH, J.; MACIEL, F. C.; OLIVEIRA, M. C.; ORSINI, M., RABELLO, A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Transactions of the Royal Institute of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 4, p. 391-395, Jul. 2003.

DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; CUPOLILLO, E.; CASTRO, A. C. C.; ALVES, T. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 43-46, Jan/Fev, 2006.

DOUGALL, A.; SHILTON, C.; LOW CHOY, J.; ALEXANDER, B.; WALTON, S. New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in Northern Australian macropods. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 10, p. 1516-1520, Mar. 2009.

DOURADO, Z. F.; SILVA, H. D.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rk39). **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 3, p. 205-214, set./dez. 2007.

EL TAI, N. O.; EL FARI, M.; MAURICIO, I.; MILES, M.A.; OSKAM, L.; EL SAFI, S. H.; PRESBER, W. H.; SCHÖNIAN, G. *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR- based analyses and DNA sequencing. **Experimental Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 35-44, Jan. 2001.

FAUST, E. C.; RUSSEL, P. F.; JUNG, R. C. **Parasitologia Clínica**. ed. México: **Salvat**, 1974.

FAYZI, M. A. H.; FANID, L. M.; FAYZI, A. A. H.; POUR, M. A. M.; FARAJNIA, S.; NAKHLBAND, A. Detection of *Leishmania infantum* minicircle kinetoplast DNA in bone marrow and peripheral blood samples of paediatric patients from Children`s Hospital of Tabriz Medical University. **Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 175-181, Jul. 2008.

FERNANDES, O.; BOZZA, M., PASCALE, J. M.; DE MIRANDA, A. B., LOPES, U. G.; DEGRAVE, W. M. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania (Viannia)*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 91, n. 4, p. 279-284, Jul. 1996.

FERNANDES, O.; CASTANHO, M. P.; SEGURA, I.; LABRADA, L. A.; DERRE, R.; SARAIVA, N.; DEGRAVE, W. Minicircle variable region probes for characterization of *Leishmania (Viannia)* species. **The Journal of Parasitology**, v. 85, n. 3, p. 563-568, Jun. 1999.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. **Editora Embrapa-Brasil**, 1998.

FERROGLIO, A.; ROMANO, A.; TRISCIUOGGIO, A. M.; POGGIB, E.; GHIGGIC, P.; SACCHIA, A.; BIGLINO, D. Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 7, p. 636-641, Dec. 2006.

FICHOUX, L., QUARANTA, Y., AUFEUVRE, J.F., LELIEVRE, MARTY, J.P., SUFFIA, A.P., ROUSSEAU, I., KUBAR, D. J. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in na area of endemicity in southern France. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p.1953-1957, Jun. 1999.

FIOCRUZ – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Biomanguinhos). Kit IFI Leishmaniose Canina. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/interna/reativos_leishmania.htm > Acesso em: 01 de julho de 2011.

FRAGA, T. L.; BRUSTOLONI, Y. M.; LIMA, R. B.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, J.; OLIVEIRA, A. L. L.; PIRMEZ, C. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 3, p. 310-313, May. 2010.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SANCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, Feb. 2006.

FRADE, A. F. Leishmaniose visceral e susceptibilidade genética. **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 22-25, Jul. 2011.

FURLAN, M. B. G. Epidemia de leishmaniose visceral no município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília**, v. 19, n. 1, p. 15-24, jan./mar. 2010.

GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 10. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 56-72, 2004.

GENARO, O.; MARQUES, M. J.; REIS, A. B.; SILVA, A. L. F. F.; MICHALICK, M. S. M.; COSTA, C. A.; MAYRING, W.; DIAS, M. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10ed São Paulo: Atheneu, p.56-72, 2000.

GOMES, A. H. S.; FERREIRA, I. M. R.; LIMA, M. L. S. R.; CUNHA, E. A.; GARCIA, A. S.; ARAÚJO, M. F. L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 3-4, p. 234-241, 2007.

GONTIJO, C. M.; MELO, M. N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-49, Set. 2004.

GREVELINK, S. A.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 34, n. 2, p. 257-272, Feb. 1996.

GRIMALDI, Jr. G.; TESH, R. B. McMAHONPRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 6, p. 687-725, 1989.

HASHIGUCHI, Y; GOMEZ, EA; DE CORONEL, V. V.; MIMORI, T.; KAWABATA, M.; FURUYA, M.; NONAKA, S.; TAKAOKA, H.; ALEXANDER, J. B.; QUIZHPE, A.; ANDEAN, M. leishmaniasis in Ecuador caused by infection with *Leishmania Mexicana* and *L. major*-like parasites. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 44, n. 2, p. 205-217, Feb. 1991.

HARRIS, E.; KROPP, G.; BELLI, A.; RODRIGUEZ, B., AGABIAN, N. Single-Step Multiplex PCR Assay for Characterization of New World *Leishmania* Complexes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p.1989-1995, Jul. 1998.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis, **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p.1191-1199, Oct. 1999.

HIDE, M., BAÑULS, A. L., TIBAYRENC, M. Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. **Parasitology**, v.123, n. 5, p. 425-432, Nov. 2001.

IÑIGUEZ, S.R.; DEA-AYUELA, M.A.; SANCHEZ-BRUNETE, J.A.; TORRADO, J.J.; ALUNDA, J.M.; BOLAS-FERNANDEZ, F. Real time reverse transcription-PCR quantification of cytokine mRNA expression in golden syrian hamster infected with *Leishmania infantum* and treated with a new amphotericin b formulation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1195-1201, Apr. 2006.

KERR, S. F. Palaeartic origin of *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p.75–80. Jan./Fev. 2000.

KUBISTA M.; ANDRADE J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STAHLBERG, ANDERS, ZORIC, N. The Real Time Polymerase Chain Reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 95–125, Apr./Jun. 2006.

KUHLS, K.; MAURICIO, I. L.; PRATLONG, F.; PRESBER, W.; SCHONIAN, G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 11-12, p.1224-1234, Aug. 2005.

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210-215, Jan. 2002.

LACHAUD, L. E.; CHABBERT, P.; DUBESSAY, J.; REYNES, J.; LAMOTHE, P.; BASTIEN, P. Comparison of various sample preparation methods for PCR Diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.2, p. 613–617, Feb. 2001.

LACHAUD, L. J.; DEREURE, E.; CHABBERT, J.; REYNES, J.M.; MAUBOUSSIN, E.; OZIOL, J.; DEDET, P.; BASTIEN, P. Optimized PCR using patient blood Samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis with special Reference to AIDS patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 236–240, Jan. 2000.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis – the Neotropical *Leishmania* species. In: Cox, F. E.; KREIER, J. P.; WAKELIN, D.; editors. Topley & Wilson's, **Microbiology and Microbial Infections**. 9th ed. London: Hodder Headline Group, v. 5, p. 241-266. 1998.

LAINSON, R; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In PETERS, W. and KILLICK-KENDRICK, R. (Eds.), **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, Academic Press, London, v. 1, p. 1-120, 1987.

LAINSON, R., READY, P. D.; SHAW, J. J. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 206, n. 1164, p. 307-318, Dec. 1979.

LAVERAN, A.; MESNIL, F. Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav.; Mesn.). Parasite d'une fièvre de l'Inde. **Comp. R. Hébd. Séanc. Acad. Sci.**, v. 137, p. 957-961, 1903.

LEONTIDES, L. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A. F.; GALATOS, A. D.; MYLONAKIS, M. E. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v. 109, n. 1-2, p. 19-27, Oct. 2002.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E.; DEROUX, G.; GRAIN, J., HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, J., LYNN, D., MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the protozoa. **Journal Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37-58, Aug. 1980.

LIMA JUNIOR, M. S. C.; ANDREOTTI, R.; DORVAL, M. E. M. C.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. G.; MATOS, M. DE F. C. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 303-307, Mai./Jun. 2009.

LIVNI, N.; ABRAMOWITZ, A.; LONDNER, M.; OKON, E.; MORAG, A. Immunoperoxidase method of identification of *Leishmania* in routinely prepared

histological sections. **Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 401, n. 2, p.147-151, 1983.

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. P.; KUHLS, K.; TINTAYA, K. W.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNÍK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 22, p. 9375–9380, May. 2007.

LYNN, M. A., MCMASTER, W. R. *Leishmania*: conserved evolution – diverse diseases. **Trends Parasitology**, v. 24, n. 3, p.103-105. Mar. 2008.

MAIA, C., CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274-287. Dec. 2008.

MALLA, N., MAHAJAN, R.C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 3, p. 267-274, Mar. 2006.

MANSON-BAHR, P. E. C. **Manson's Tropical Diseases**. 20th Ed.; W. B. Sanders. Filadélfia, EUA. p. 206-217, 1996.

Mansur, B.G. **Atualização em diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina**. Disponível em: <http://www.santelaboratorio.com.br/informativos/AtualizacaoemDiagnostico.pdf>. Acesso em: 15 de dezembro 2009.

MARFURT, J.; NIEDERWIESER, I.; MAKIA, N.D.; BECK, H. P.; FELGER, I. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 46, p.115 -124. Jun. 2003.

MARFURT, J.; NASEREDDIN, A.; NIEDERWIESER, I.; JAFFE, C. L.; BECK, H.P.; FELGER, I. 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, Jul. 2003a.

MARFURT, J.; NIEDERWIESER, I.; MAKIA, N. D.; BECK, H.; FELGER, I. Diagnostic genotyping of old and new world *Leishmania* species by PCR-RFLP. **Diagnostic microbiology and infectious disease**. v. 46, n. 2, p. 115-124, Jun. 2003b.

MARTÍN-EZQUERRA, G.; FISA, R.; RIERA, C.; ROCAMORA, V.; FERNÁNDEZ-CASADO, A.; BARRANCO, C.; SERRA, T.; BARÓ, T. Role of *Leishmania* spp. infestation in non diagnostic cutaneous granulomatous lesions: report of a series of patients from a Western Mediterranean area British, **Journal of Dermatology**, v. 161, n. 2, p. 320-325, Aug. 2009.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5249-5255, Nov. 2004.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W.J.; AMENDOEIRA, M. R.; Leishmaniose visceral (Calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 41, n. 5, p. 61-84, 1981.

MARZOCHI, M. C.; COUTINHO, S. G.; SABROZA, P. C.; DE SOUZA, W. J. Indirect immunofluorescence reaction and intradermoreaction for American cutaneous leishmaniasis in residents of the Jacarepaguá region (Rio de Janeiro). Comparative study of results observed in 1974 and 1978. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 22, n. 3, p.149-155, 1980.

MATEUS, R. P.; CERON, C. R.; MACHADO, L. P. B; SENE, F.M.; Caracterização preliminar do espaçador interno transcrito-1 its-1 do DNA ribossômico nas espécies do *cluster buzzatii* de *drosophila* (diptera: drosophilidae). **Ambiência**, v. 2, n. 1, p. 89-96, Jan.2006.

MATO GROSSO DO SUL (Estado). Secretaria de Estado de Saúde. Número Absolutos de Casos de Leishmaniose Visceral, Mato Grosso do Sul, 1999-2010, SINAN, 2010. Disponível em: <http://www.sgi.ms.gov.br/pantaneiro/sites/saude/index.php?templat=list&voltar=home&id_comp=634>. Acesso em: 23 jun. 2010.

MAURICIO, I. L.; GAUNT M. W.; STOTHARD, JR.; MILES, M. A. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 393-403, Apr. 2001.

MAYR, E. Populações, Espécies e Evolução. **Companhia Editora Nacional**. Universidade de São Paulo, p.485, 1970.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515–5519, Nov. 2005.

MIJAK, P.; SZULTA, J.; DE ALMEIDA, M. E.; DA SILVA, A.J.; STEURER, F.; LASS, A.; PIETKIEWICZ, H.; NAHORSKI, W.L.; GOLJAN, J.; KNAP, J.; SZOSTAKOWSKA, B.; Usefulness of PCR Method for Detection of *Leishmania* in Poland. **Polish Journal of Microbiology**, v. 58, n.3, p. 219-222, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: **Relatório de Situação: Mato Grosso do Sul**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009b.

MOMEN, H.; CUPOLILLO, E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 583-8, Jul./Aug. 2000.

MOMEN, H; GRIMALDI, G. JR.; PACHECO, R. S.; JAFFE, C.L.; MCMAHON-PRATT, D; MARZOCHI, M. C. Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to *Leishmania major*. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 6, p.1076-1084, 1985.

MORTARINO, M.; FRANCESCHI, A.; MANCIANTI, F.; BAZZOCCHI, C.; GENCHI, C.; BANDI, C. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. **Parasitologia**, v. 46, n. 1-2, p. 163-167, Jun. 2004.

MOSSER, D.M.; ROSENTHAL, L. A. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. **Seminars in cell developmental biology**, v. 4, n. 1, p.315-322, 1993.

MOSSER, D. M.; L. A. BRITTINGHAM. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiples ligands and diverse cellular responses. **Seminars in cell developmental biology**, v. 4, n. 5, p.9-23. 1997.

MOTAZEDIAN, M.; FAKHAR, M.; MOTAZEDIAN, M. H.; HATAM, G.; MIKAEILI, F. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, n. 2, p.151-154, Feb. 2008.

NASEREDDIN, A.; AZMI, K.; JAFFE, C.L.; EREQAT, S.; AMRO, A., SAWALHAH, S.; BANETH, G.; SCHÖNIAN, G.; ABDEEN, Z. Kinetoplast DNA heterogeneity among *Leishmania infantum* strains in central Israel and Palestine. **Parasitology veterinary**, v.161, n. 1-2, p. 126-130, Abr. 2009.

NEOUMINE, N. I. Leishmaniasis in the Eastern Mediterranean Region. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 2, n. 1, p. 94-101, 1996.

NICOLAS, L.; PRINA, E.; LANG, T.; MILON, G. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p.1666–1669, May. 2002.

NICOLLE, C. Nouvelles acquisitions sur le kala-azar: culture; inoculation au chien; etiologie. **Compte rendu hebdomadaire des Sciences de l'Academie des Sciences**, v. 87, p. 7-13, 1908.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13, Jul./ Dez. 2004.

NOYES, H. Implications of a neotropical origin of the genus *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93 n. 5, p. 657-61, sep. 1998.

NUNES, V. L. B.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; NOGUCHI, R. C.; ARÃO, L. B.; HANS FILHO, G.; ESPÍNDOLA, M. A.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; SERAFINE, L. N., SANTOS D. Estudo epidemiológico sobre Leishmaniose Tegumentar (LT) no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul - estudos na população humana.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 28, n.3, p. 185-193, Jul./Sep.1995.

NUNES, V, L, B. **Condicionantes para a transmissão de leishmanioses em assentamento agrícola do INCRA e adjacências, Planalto da Bodoquena, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil**, 2001. Doutorado [Tese de Doutorado em Saúde Pública]. Faculdade de Saúde Pública/ USP . São Paulo 2001.

NYGREN, J.; SVANVIK, N.; KUBISTA, M. The interaction between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. **Biopolymers**, v. 46, n. 1, p. 39-51, Jul. 1998.

ODIWUOR, S. O. C.; SAAD, A. A.; DONCKER, S. D.; MAES, I.; LAURENT, T.; SAFI, S. E.; MBUCHI, M.; BÜSCHER, P.; DUJARDIN, J. C.; AUWERA, G. V. Universal PCR assay for differential detection of all Old World *Leishmania* species. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v. 30, n. 2, p. 209-218, 2010.

OLIVEIRA, A. L. L.; PANIAGO, A. M. M.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; LEAL, C. R.; SANCHES, M.; CUNHA, R. V.; BÓIA, M. N. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 446-450, Sep./Oct. 2006.

OSMAN, O. F.; OSKAM, L.; ZIJLSTRA, E. E.; KROON, N. C.; SCHOONE, G. J.; KHALIL, E. T.; EL-HASSAN, A. M.; KAGER, P.A. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2454-2457, Oct. 1997.

PACHECO, R. S.; BRITO, C. M. Reflections on the population dynamics of *Trypanosoma cruzi*: heterogeneity versus plasticity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p.199-201, 1999.

PACHECO, R. S.; LOPES, U. G.; MOREL, C. M.; GRIMALDI, J. R. G.; MOMEM, H. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. In: *Leishmania Taxonomy et Phylogenese. Applications Eco-epidemiologiques*. Rioux, J. A. ed., p. 57-65, IMEEE, Montpellier, 1986.

PAIVA, B. R.; OLIVEIRA, A. G.; DORVAL, M. E. M. C; GALATI, E. A. B.; MALAFRONT, R. S. Species - specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 126-130, Jul./Aug., 2010.

PAIVA-CAVALCANTI, M.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; GOMES, Y. M. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 4, p.537-542. 2010

Pan American Health Organization - PAHO. Protozoonoses: Cutaneous leishmaniasis. In: ACHA, X; ZYFRES, X. **Zoonoses and Comunicable Diseases common to man and animals**. Washington. D. C.: 55-64, 2003a.

Pan American Health Organization - PAHO. Protozoonoses: Visceral leishmaniasis. In: ACHA, X; ZYFRES, X. **Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals**. Washington. D. C.: 55-64, 2003b.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 940-950, 1934.

PERROTEY, S.; MAHAMDALLIE, S. S.; PESSON, B.; RICHARDSON, K. J.; GALLEGU, M.; READY, P. D. Postglacial dispersal of *Phlebotomus perniciosus* into France. **Parasite**, v. 12, n. 4, p. 283–291, Dec. 2005.

PIARROUX, R.; GAMBARELLI, F.; DUMON, H.; FONTES, M.; DUNAN, S.; MARY, C.; TOGA, B.; QUILICI, M. Comparison of PCR with Direct Examination of Bone Marrow Aspiration, Myeloculture, and Serology for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Immunocompromised Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 746-749, Mar. 1994.

POINAR, G. J. R.; POINAR, R. *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp. (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. **Protist**. v. 155, n. 3, p. 305–310, Sep. 2004.

POINAR, J. G. Early Cretaceous trypanosomatids associated with fossil sand fly larvae in Burmese amber. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n. 5, p. 635–637, Jul. 2007.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 713-732, 2005.

PRINA, E.; ROUX, E.; MATTEI, D.; MILON, G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. **Microbes and Infection** v. 9, n.11, p.1307-1315, Sep. 2007.

RAOULT, D.; FOURNIER, P. E.; DRANCOURT, M. What does the future hold for clinical microbiology? **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 151-159, Feb. 2004.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N.S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G., Detection of *Leishmania infantum* in Dogs by PCR with Lymph Node Aspirates and Blood. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, n. 9, p. 2931-2935. Sep.1999.

REGO Jr, F. A.; NUNES, V. L. B.; PEREIRA, M. J. S.; CAVALHEIROS, M. E. M.; SILVA, R. P.; BARROS, E. Ocorrência de casos de leishmaniose em cães no município de Corumbá- MS. In: VIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, **Resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 1983, p. 2.

REY, L. Bases da parasitologia médica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1992.

RIOUX, J. A.; LANOTTE, G.; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; PERIERES, J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Annales de Parasitologie Humaine et comparée**, v. 65, p.111–125, 1990.

RODRIGUEZ, N.; GUZMAN, B.; RODAS, A.; TAKIFF, H.; BLOOM, B. R.; CONVIT, J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2246–2252, sep. 1994.

ROLAO, N.; CORTES, S.; RODRIGUES, O. R.; CAMPINO. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 5, p. 1150-1154, Oct. 2004.

ROSE, K.; CURTIS, J.; BALDWIN, T.; MATHIS, A.; KUMAR, B.; SAKTHIANANDESWAREN, A.; SPURCK, T.; LOW CHOY, J.; HANDMAN, E. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. **Internation Journal for Parasitology**, v. 34, n. 6, p. 655-664, May. 2004.

ROSS, R. Further Notes on *Leishmania*'s bodies. **British Medical Journal** v. 11, p. 1401, 1903.

ROTUREAU, B.; RAVEL, C. L.; COUPPIÉ, P.; PRATLONG, F.; NACHER, M.; DEDET, J. P.; CARME, B. Use of PCR - restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 2, p. 459-467, Feb. 2006.

RUSSEL, D. G.; TALAMAS-ROHANA, P. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. **Immunology Today**, v. 10, n. 10, p.328-332, 1989.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 69, n. 1, p.100-103. Feb.1989.

SAF'JANOVA, V. M. Classification of the genus *Leishmania*. **Protozoology**, Union Society of Protozoologists, p. 219-220, 1982.

SALOTRA, P.; SREENIVAS, G.; POGUE, G. P.; LEE, N.; NAKHAS, H. L.; RAMESH, V.; NEGI, N. S.; Development of a Species-Specific PCR Assay for Detection of *Leishmania donovani* in Clinical Samples from Patients with Kala-Azar and Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 849-854. Mar. 2001.

SAVANI, E. S. M. M.; NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; CASTILHO, T. M., ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 18–24, Mar. 2009.

SAVANI, E. S. M. M.; OLIVEIRA CAMARGO, M. C. G.; CARVALHO, M. R.; ZAMPIERI, R. A.; SANTOS, M. G.; D'AURIA, S. R. M.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. The first Record in the Americas of an autochthonous case of

Leishmania (Leishmania) infantum chagasi in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 3, p. 229 - 233, Mar. 2004.

SCHLEIN, Y.; R. L. JACOBSON; Y., SHLOMAI, J., *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 20, p.9944-9948. Oct. 1993.

SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H. D. F. H.; PRESBER, W.; JAFFE, C. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 47, n.1, p. 349-358, Sep. 2003.

SCHULZ, A.; MELLENTHIN, K.; SCHONIAN, G.; FLEISCHER, B.; DROSTEN, C. Detection, Differentiation, and Quantitation of Pathogenic *Leishmania* Organisms by a Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Real-Time PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1529–1535, Apr. 2003.

SCHUSTER, F. L.; SULLIVAN, J. J. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. **Clinical Microbiology Revista**. v. 15, n. 3, p. 374-89, Jul. 2002.

Secretaria de Estado de Saúde, **Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN)** Campo Grande, MS, 2011.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annual review of microbiology**, v. 49, p.117-143, 1995.

SHAW, J. J. New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: Farrell, J. (Ed.), *World Class Parasites: Leishmania*. **Kluwer Academic Publishers**, Boston; pp. 11-31, 2003.

SHAW, J.; GRIMALD, G.; CUPOLILLO, E. Identificação de *Leishmania*. In: COURA, J. R. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. **Guanabara Koogan**: Rio de Janeiro, 733-737, 2005.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; DIAS, E. S.; BARROS, J. C. M.; BRAZUNA, J. C. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 343-348, Jul. 2008.

SILVA, E. S.; CARVALHO, F. G.; SILVA, E. A.; FIOZI, E.; OLIVEIRA, A. G.; BRAZIL, R. P. Primeiro relato de leishmaniose visceral canina em área urbana do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. In: **Resumos do XXXVI Congresso Brasileiro de Medicina Tropical**, São Luís, 2000, p. 318.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S.; BRAZIL, R. P. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 3, p.251-257, May. 2004.

SILVA, S. O.; WU, A. A.; EVANS, D. A.; VIEIRA, L. Q.; MELO, M. N. *Leishmania* sp. isolated from human cases of cutaneous leishmaniasis in Brazil characterized as *Leishmania major*-like. **Acta Tropica**, v.112, n. 3, p. 239-248, Dec. 2008.

SIMPSON, L.; SIMPSON, A. M.; KIDANE, G.; LIVINGSTON, L.; SPITHILL, T. W. The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. **The American journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 29, S. 5, p. 1053-1063, Sep.1980.

SINGH, S; SIVAKUMAR, R. Recent Advances in the Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49, n.1, p. 55-60, Jan-Mar. 2003.

SOUZA, A. I.; BARROS, E. M.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I. M.; MARIN, G. R.; NUNES, V. L. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology** v. 128, n. 1-2, p.41-45, Mar. 2005.

SOUZA, A. I.; NUNES, V. L. B.; BORRALHO, V. M.; ISHIKAWA, E. A. I. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul State, Brazil: a case report. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, n. 2, v. 15, p. 359-365, May. 2009.

SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 105, n. 1, p. 1–6, Jan. 2011.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical Diagnosis Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-8, Set. 2002.

SUNDSFJORD, A.; SIMONSEN, G. S.; HALDORSEN, B. C.; HAAHEIM, H.; HJELMEVOLL, S. O.; LITTAUER, P.; DAHL, K. H. Genetics methods for detection of antimicrobial resistance. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica, Blegdamsvej**, v. 112, n. 11-12, p. 815-837, Nov. /Dec. 2004.

SVOBODOVA, M.; VOTÝPKA, J.; NICOLAS, L.; VOLF, P. *Leishmania tropica* in the Black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sandfly vector *Phlebotomus sergenti*. **Microbes and Infections**, v. 5, n.5, p.361–364, Apr. 2003.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M. E.; GONÇALVES, R.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n. 1-2, p. 17– 23, Sep. 2004.

THOMAZ-SOCCOL, V.; LANNOTE, G.; RIOUX, J. A ; PRATLONG, F.; MATINI-DUMAS, A.; SERRES, E. Phylogenetic taxonomy of the New World *Leishmania*. **Annals de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 68, n. 2, p.104-106, 1993.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Towards a population genetics of micro-organisms: The clonal theory of parasitic protozoa. **Parasitology Today**, v. 7, n. 9, p. 228-232, 1991.

TIBAYRENC, M.; KJELLBERG, F.; AYALA, F. J. A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. **Proceeding of the National Academy of Science USA**, v. 87, n. 7, p. 2414-2418, Apr. 1990.

TIBAYRENC, M. Beyond strain typing and molecular epidemiology: Integrated genetic epidemiology of infectious diseases. **Parasitology Today**, v. 14, n. 8, p. 323- 329, Aug. 1999.

TUPPERWAR, N.; VINEETH, V.; RATH, S.; VAIDYA, T. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 61, n. 1, p. 23-30, May. 2008.

ULIANA, S. R. B.; ISHIKAWA, E.; STEMPLIUK, V. A.; DE-SOUZA, A.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. Geographical distribution of neotropical *Leishmania* of the subgenus *Leishmania* analysed by ribosomal oligonucleotides probes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 261-264, 2000.

VAN DER MEIDE, W.; GUERRA, J.; SCHOONE, G.; FARENHORST, M.; COELHO, L.; FABER, W.; PEEKEL, I.; SCHALLIG, H. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 1, p. 73-78, Jan. 2008.

VAN DER PLOEG, L. H.; CORNELISSEN, A. W.; BARRY, J. D.; BORST, P. Chromosomes of kinetoplastida. **The EMBO journal**, v. 3, n. 3, p. 3109-3115, 1984.

VITALE, F.; REALE, M.; VITALE, E.; PETROTTA, E.; TORINA, A.; CARACAPPA, S. Taq Man based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1026, p.139–143. Oct. 2004.

VOLPINI, A. C.; PASSOS, V. M. A.; ROMANHA, A. J. Attempt to differentiate *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *L. (L.) chagasi*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* using the SSR-PCR technique. **Parasitology Research**, v. 87, p. 1056-1059, 2001.

VOLPINI, A., C.; PASSOS, V., M., A.; OLIVEIRA, G., C.; ROMANHA, A., J. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania)* *amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 90, n.1, p. 31-37, 2004.

WHO. Control of the Leishmaniases. **World Health Organization**, Geneva, 793: 158, 1990.

WOOLHOUSE, M. E.; TAYLOR, L.H.; HAYDON, D.T. Population biology of multihost pathogens. **Science**, v. 292, p.1109–1112, 2001.

WORTMANN, G. W.; ROMERO, L. I.; PAZ, H. M.; ORTEGA-BARRIA, E.; BAYARD V.; HOCHBERG, L. P.; RYAN, J.R. Real-time polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis in Panamá from both fresh and frozen tissue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 148-151, 2004.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR-based diagnostics for infections diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. **The Lancet**, v. 4, n. 6, p.337-348, Jun. 2004.

YAMASAKI, H.; AGATSUMA, T.; PAVON, B.; MORAN, M.; FURUYA, M.; AOKI, T. Leishmania major-like parasite, a pathogenic agent of cutaneous Leishmaniasis in Paraguay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 6, p. 749-757, 1994.

ZAIDI, N.; KONSTANTINOOU, K.; ZERVOS, M. The role of molecular biology and nucleic Acid technology in the study of human infection and epidemiology. **Archives of pathology & laboratory medicine**. v. 127, n. 9, p. 1098-105, Set. 2003.

ZEMANOVÁ, E.; JIRKU, M.; MAURÍCIO, I. L.; MILES, M. A.; LUKES, J. Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 6, p.613-7, jun. 2004.

ZERPA, O.; ULRICH, M.; BENITEZ, M.; AVILA, C.; RODRIGUEZ, V.; CENTENO, M.; BELIZARIO, D.; REED, S.G.; CONVIT, J. Epidemiological and immunological aspects of human visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, n. 8, p. 1079-83, Dez. 2002.

ZIJLSTRA, E.E.; NUR, Y.; DESJEUX, P.; KHALIL, E.A.; EL-HASSAN, A.M.; GROEN, J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. **Tropical Medicine International Health**. v. 6, n. 2, p. 108-13, Fev. 2001.

ZIMMERMANN, S., MOLL, H., SOLBACH, W., LUDER, C.G., Meeting Report IFoLeish-2008: Current Status and Future Challenges in *Leishmania* Research and Leishmaniasis. **Protist**. v. 160, p. 151-158, 2009.

ZIPPER, H., BRUNNER, H., BERNHAGEN, J., VITZTHUM, F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 12, p.103, 2004.

ANEXO A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa/CEP/UFMS



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS



Carta de Aprovação

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1340 da Pesquisadora Maria de Fátima Cepa Matos intitulado “Caracterização molecular de isolados regionais de Leishmania sp. de casos humanos”, foi revisado por este comitê e aprovado em reunião ordinária no dia 11 de dezembro de 2008, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. Odair Pimentel Martins

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 12 de dezembro de 2008.