

# **Avaliação da PCR-RFLP para o diagnóstico e identificação de *Leishmania* sp: uma comparação com os métodos parasitológicos e imunológicos**

Anna Karoline Aguiar Fleuri<sup>1</sup>, Ledice Inácia de Araújo Pereira<sup>2</sup>, Marco Vítor Silva de Melo Costa<sup>3</sup>, Sebastião Alves Pinto<sup>4</sup>, Fátima Ribeiro-Dias<sup>5</sup>, Miriam Leandro Dorta<sup>6</sup>

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás

Email: karoline.af@gmail.com, mldorta@uol.com.br

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar Americana, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, PCR-RFLP.

## **1 INTRODUÇÃO**

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma antroponose com diferentes manifestações clínicas e representa um grande problema de saúde pública. Segundo o Ministério da Saúde, estima-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção em todo o mundo com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (BRASIL, 2007). No Brasil, a incidência de LTA tem aumentado nos últimos anos. Em 2003 foi confirmada autoctonia em todas as unidades federadas do país, a região Norte vem contribuindo com o maior número de casos - cerca de 37,3% do total de casos registrados, seguida das regiões Centro-oeste - 32,6 casos por 100.000 habitantes - e Nordeste - 16,1 casos por 100.000 habitantes (BRASIL, 2009).

A LTA é causada por protozoários pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). Estes parasitos apresentam ciclo de vida heteróxico, ou seja, vivem alternativamente em hospedeiros vertebrados e em insetos vetores, estes transmitem os parasitos aos hospedeiros vertebrados ao realizar repasto sanguíneo (BARAK et al., 2005; MAURER et al., 2009). Durante seu ciclo de vida, estes parasitos apresentam duas formas bioquimicamente e morfolologicamente distintas: formas amastigotas que são arredondadas e não apresentam flagelo livre, estas são encontradas nas células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado e formas promastigotas que são alongadas e possuem um único flagelo livre, são encontradas no trato digestivo do inseto vetor e podem ser mantidas em cultura axênica, *in vitro* (GONTIJO & CARVALHO, 2003; MAURER et al., 2009).

---

Revisado pelo orientador

1. Graduanda em Biomedicina na UFG; 2. Doutoranda do PMTSP/IPTSP/UFG; 3. Técnico do laboratório/IPTSP; 4. Professor FM/UFG - INGOH; 5. Professora do DMIPP/ IPTSP; 6. Orientadora DMIPP/ IPTSP

As manifestações clínicas da LTA no homem podem variar desde uma simples lesão cutânea até lesões destrutivas da mucosa, como consequência de uma complexa resposta imunológica do hospedeiro e diversidade genética da espécie envolvida na infecção. Uma única espécie deste parasito pode causar diferentes manifestações clínicas dependendo da virulência do parasito e da resistência do hospedeiro à infecção (GARCIA et al., 2005; SILVEIRA et al., 2009). O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros, *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*), de acordo com o desenvolvimento das formas promastigotas no intestino do vetor (LAINSON; SHAW, 1988). Atualmente são conhecidas aproximadamente 20 espécies de leishmânia capazes de infectar o homem (STUART et al., 2008), sendo que *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* são os principais agentes causadores de LTA no Brasil, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi*, *Leishmania* (*Viannia*) *shawi* e *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* são encontradas em algumas regiões do Brasil, como Amazônia e Pará (GONTIJO; CARVALHO, 2003). A infecção causada por espécies do subgênero *Viannia* é mais invasiva e pode haver recidivas após o tratamento e disseminação do parasito para as regiões de mucosas ocasionando a forma mucosa da LTA (SILVEIRA et al., 2009; MICROPOULOS et al., 2010).

Para diagnóstico da LTA, dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais devem ser frequentemente associados. Uma extensa anamnese, com colheita de dados clínicos e epidemiológicos, seguida de diagnóstico diferencial de várias outras doenças que causam lesões cutâneas ou mucosas, deve ser feita inicialmente. O diagnóstico parasitológico é feito através do exame direto, cultivo dos parasitos *in vitro* ou *in vivo*. A pesquisa de parasitos também é feita em cortes histológicos dos fragmentos das biópsias que pode ser sua sensibilidade aumentada quando associada à Imunohistoquímica. O diagnóstico imunológico consiste na pesquisa de anticorpos ou células leishmânia-específicas, respectivamente, imunofluorescência indireta (IFI) e intradermorreação de Montenegro (IRM) (GONTIJO ; CARVALHO, 2003; HERWALDT, 1999). A descoberta da amplificação *in vitro* do DNA utilizando uma polimerase – reação em cadeia da polimerase, PCR (MULLIS; FALOONA, 1987) possibilitou o surgimento de marcadores moleculares que são úteis em análises filogenéticas, taxonomia e no diagnóstico molecular de patologias. Diante das dificuldades encontradas no diagnóstico da LTA - em muitos casos, os testes utilizados na rotina apresentam baixa sensibilidade, consomem muito tempo ou requerem condições de cultivo dos parasitos e muitas vezes ocorrem contaminações (SHAHBAZI et al., 2008) - a PCR representa uma poderosa ferramenta de diagnóstico.

Nas últimas décadas vários métodos baseados na PCR vêm sendo desenvolvidos, entre eles os que têm como alvo microssatélites, DNA do cinetoplasto (kDNA), seqüências genômicas repetitivas e RNA ribossomal (FLOETER-WINTER; SHAW, 2004). Entre estes métodos a técnica “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) ou polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição, que é baseada na restrição de um fragmento de DNA por endonucleases que clivam esta molécula em sítios específicos gerando perfis de restrição, tem mostrado resultados promissores para a caracterização de *Leishmania* spp (VOLPINI et al., 2004; ROTUREAU et al., 2006). Esta técnica tem sido associada a PCR, conhecida como PCR-RFLP, que é baseada na amplificação de um fragmento específico do kDNA e a sua subsequente restrição com enzimas que clivam esta molécula em sítios específicos de reconhecimento, conhecidos como sítios de restrição. Essa união permitiu a distinção das diferentes espécies de *Leishmania* sp. Devido à reprodutibilidade e à alta sensibilidade deste método ele tem sido utilizado para o diagnóstico e identificação de *Leishmania* (VOLPINI et al., 2004; GARCIA, et al., 2006; ROMERO et al., 2009).

Segundo Garcia et al. (2004) as ferramentas de caracterização genética combinam cinco elementos: - aplicabilidade direta em tecidos humanos, - análises fáceis e rápidas, - associação em taxonomia, - identificação de espécies e tipos de espécies, - mapeamento genético. No Brasil e no mundo esta reação tem sido utilizada para o diagnóstico da LTA (CASTILHO et al., 2003; DEGRAVE et al., 1994; PAIVA et al., 2004; SHAHBAZI et al., 2008; VELASQUEZ et al., 2006; VOLPINI et al., 2004), uma vez que, a determinação da espécie infectante é um passo importante para análises epidemiológicas, determinação de prognóstico, definição do regime terapêutico e medidas profiláticas (PAIVA et al., 2004). O presente trabalho tem como principal objetivo a detecção e identificação molecular das espécies de *Leishmania* obtidas de biópsias de pacientes com suspeita de LTA atendidos no ambulatório de endemias do Hospital de Doenças Tropicais de Goiânia-GO utilizando a técnica PCR-RFLP.

## **2 OBJETIVOS**

- Identificar os subgêneros de *Leishmania* em fragmentos de biópsia oriundos de lesões cutâneas e mucosas de pacientes com LTA;
- Comparar a sensibilidade entre as técnicas de rotina utilizadas para o diagnóstico da LTA e o diagnóstico molecular.
- Avaliar a contribuição da PCR-RFLP para o diagnóstico da LTA;

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Pacientes**

Os pacientes que apresentavam suspeita de LTA atendidos no ambulatório de endemias do Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad (HDT) de Goiânia, Goiás, entre julho de 2010 a maio de 2011 foram incluídos neste estudo. A LTA foi diagnosticada por meio dos aspectos clínicos, dados epidemiológicos e exames laboratoriais, sendo estes o isolamento do parasito *in vitro*, a intradermoreação de Montenegro (IRM), histopatológico e imunofluorescência indireta. O projeto é associado ao projeto “Banco imunobiológico (*Leishbank*) das leishmanioses da região Centro-Oeste e projetos associados”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal e Humana do Hospital das Clínicas (HC/UFG) e todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para participarem da pesquisa (Protocolo 125/04).

#### **3.2 Camundongos**

Camundongos isogênicos, machos com idade entre seis a oito semanas, da linhagem C57BL/6 deficientes em interferon- $\gamma$  (C57BL/6 IFN- $\gamma$ KO) criados e mantidos no Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG), foram usados para isolamento *in vivo* de leishmânia.

#### **3.3 Processamento das Amostras**

Fragments de biópsias, obtidos da lesão de pacientes com suspeita de LTA, foram divididos em duas partes: uma parte destinada à caracterização molecular e outra destinada ao isolamento *in vivo* e *in vitro* dos parasitos. Os fragmentos destinados ao isolamento foram macerados em 500  $\mu$ L de solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,3, desta suspensão, 50  $\mu$ L eram inoculados no coxim plantar de camundongos C57BL/6 IFN- $\gamma$ KO para isolamento *in vivo* e o restante era colocada em garrafas para cultura de células de 25  $\text{cm}^2/\pi\text{cm}^2$  (Costar, Cambridge, MA, EUA), contendo 4 mL de meio Grace completo (Grace's Insect Medium, Sigma Chemical Co., St Louis, MD, EUA), suplementado com 20% Soro Fetal Bovino (SFB, Cripion, Andradina, SP, Brasil) inativado, 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co., St Louis, MD, EUA), 200 U/mL de penicilina (Sigma) e 200  $\mu$ g/mL de

estreptomicina (Sigma). A cultura era incubada a 26°C, até o crescimento dos parasitos (descarte apos quatro semanas caso não houvesse crescimento). Após 4 a 8 semanas do inóculo, os animais eram sacrificados e as patas e os linfonodos drenantes da lesão (poplíteo) eram retirados e macerados em PBS; parte desta era cultivada em garrafas de cultura de células a 26°C e parte era re-inoculada em novos camundongos C57Bl/6 IFN- $\gamma$  KO, para manutenção do parasito *in vivo*.

### 3.4 Amostras de referência de *Leishmania* sp.

Como padrões de referência foram utilizadas duas amostras da Organização Mundial de Saúde (UNDP/WORLD BANK/WHO, 1990) e que são mantidas criopreservadas no Laboratório de Imunidade Natural e Imunobiologia das Leishmanioses do IPTSP/UFG (TABELA 1).

**Tabela 1.** Amostras de referência da Organização Mundial de Saúde utilizadas no estudo.

Amostra de referência	Código internacional
PH8 - <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	IFLA/BR/1968/PH8
M2903 - <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903

### 3.5 Extração do DNA das amostras

Para obtenção de um lisado do tecido das biópsias, lavou-se exaustivamente o fragmento de biópsia em PBS, em seguida macerou-se este material e acrescentou-se 100  $\mu$ L de TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA pH 8,0). A extração do DNA foi realizada utilizando-se o kit de extração *illustra<sup>TM</sup>blood genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK.), conforme instruções do fabricante. O material obtido foi armazenado a -20°C.

### 3.6 Cultivo dos Parasitos e Criopreservação

Havendo o crescimento de parasitos, estes foram cultivados em meio Grace completo conforme descrito no item 3.3. Após a adaptação às culturas *in vitro*, os parasitos foram repicados a cada 48 - 72 horas iniciando a cultura com 5 x 10<sup>5</sup> parasitos/mL ou com 1 x 10<sup>6</sup> parasitos/mL (em caso de isolados que apresentem menor taxa crescimento *in vitro*). A

quantificação dos parasitos foi realizada, após diluição de uma alíquota da cultura em formalina 0,2%, em hematocitômetro. Os parasitos foram criopreservados em nitrogênio líquido, em fase logarítmica do crescimento, para isto  $1 \times 10^7$  parasitos/mL foram adicionados a uma mistura contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Co., St Louis, MD, EUA) e 80% de SFB sendo, em seguida, transferidos para  $-80^{\circ}\text{C}$  por dois dias e depois estocados em nitrogênio líquido (*Leishbank*, Banco Imunobiológico das Leishmanioses da Região Centro-Oeste, IPTSP/UFG).

### 3.7 Caracterização Molecular de *Leishmania* sp.

#### 3.7.1 Reação em Cadeia da Polimerase para caracterização dos subgêneros e espécies de *Leishmania* sp.

Os iniciadores utilizados no estudo foram desenhados para amplificação da região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania* desenvolvido por Passos et al. (1996), gerando fragmentos de 120 pb para espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* (*Viannia*) e 116 pb para *L. (L.) amazonensis*. As características dos iniciadores utilizados estão representadas na TABELA 2.

**Tabela 2.** Características dos iniciadores de kDNA utilizados na PCR-RFLP

Primer	Seqüência 5' – 3'	Nt	G + C
150	GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA	20	68%
152	(C/G)(C/G)C/G(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC	22	50%

Nt: número de nucleotídeos

Para a reação inicial da PCR foi utilizado 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs utilizando-se dUTP em substituição a dTTP a fim que se evitasse anelamentos inespecíficos, (dUTP, dATP, dCTP), 0,8 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), tampão (10 mM de Tris-HCl pH 8,6, 50 mM de KCl, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ ) e 1  $\mu\text{L}$  de DNA para um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . As condições de reação foram: desnaturação inicial a  $94^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, desnaturação intermediária a  $94^{\circ}$  por 45 segundos, anelamento a  $59^{\circ}$  por 45 segundos, extensão intermediária a  $72^{\circ}$  por 30 segundos e extensão final a  $72^{\circ}\text{C}$  por 7 minutos, em um total de 35 ciclos. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida a 8%, sob condições não desnaturante, a 40 mA em tampão de corrida TBE 1X no sistema de minigel (BIORAD).

Em seguida, os géis foram colocados em solução fixadora (etanol a 10%, ácido acético a 0,5%), por 10 minutos sob constante agitação, corados pelo nitrato de prata a 0,3% por 15 minutos, lavados por 2 minutos em água deionizada e incubados em solução reveladora (0,75 M de NaOH, 0,1 M de formaldeído) até o aparecimento de bandas (aproximadamente 10 minutos). A reação de coloração foi interrompida pela remoção da solução reveladora e adição da solução fixadora. Após a coloração os géis foram fotografados e digitalizados.

### **3.7.2 Análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de DNA (RFLP)**

Para a análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de DNA (RFLP) foi utilizada a enzima de restrição *Hae III*, com sítios de restrição específicos para *L. (L.) amazonensis* e espécies do subgênero *Leishmania (Viannia)*, respectivamente (VOLPINI et al., 2000 - patenteada no Brasil -BRPI 0004507-1). Os produtos da amplificação da PCR de todos os isolados incluindo as amostras de DNA das cepas de referência foram submetidos ao tratamento com *Hae III*. Para visualização dos fragmentos gerados pela RFLP foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, não desnaturante, e coloração pelo nitrato de prata, conforme descrito no item 3.7.1.

### **3.8 Análise estatística dos resultados**

Os resultados obtidos pelos exames intradermoreação de Montenegro (IRM), imunofluorescência indireta (IFI), análise histopatológica associada à imuno-histoquímica, isolamento *in vivo* e isolamento *in vitro* foram comparados ao resultado obtido pelo diagnóstico molecular utilizando-se o teste do  $\chi$  - quadrado. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 4.0 (San Diego, CA, EUA).

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Dados dos pacientes**

Entre janeiro de 2009 a maio de 2011 foram processadas 51 amostras de fragmentos de biópsias obtidas de lesão cutânea ou de lesão mucosa de pacientes com

suspeita de LTA atendidos no ambulatório de endemias do Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad, Goiânia, GO. Destes, foram confirmados o diagnóstico de LTA em 47 pacientes, dois pacientes não retornaram com os resultados dos exames (NC) e dois apresentavam outras patologias.

Dentre os pacientes confirmados, 37 apresentavam a forma cutânea (LC), sete a forma mucosa (LM) e três a forma cutâneo-mucosa (LCM). Os prováveis locais de infecção desses pacientes foram os estados de Goiás (n = 22), Mato Grosso (n = 6), Pará (n = 4), Amazonas (n = 2), Maranhão (n = 2), Rondônia (n = 2), Minas Gerais (n = 1), Acre (n = 1), Amapá (n = 1), Roraima (n = 1) e em dois casos os locais não foram informados. Dentre estes 34 (72%) eram do gênero masculino e 13 (28%) do gênero feminino. A idade dos pacientes variou entre 13 a 72 anos, com mediana de 43 anos. O número de lesões cutâneas variou entre uma a 21 e o tempo de lesão de 15 dias a 20 anos. Muitos dos pacientes se infectaram com *Leishmania sp* devido a sua atividade ocupacional, a maioria relatou a profissão de lavrador.

#### 4.2 Dados Laboratoriais dos Pacientes com Suspeita de LTA

O diagnóstico dos pacientes foi realizado através de exames clínico-epidemiológicos e laboratoriais. A confirmação diagnóstica baseou-se nos critérios preconizados pelo Manual de Vigilância da LTA (BRASIL, 2007). Dentre os 51 pacientes atendidos com suspeita de LTA, em dois o diagnóstico para LTA não foi confirmado (PVN9 e DTS9), estes apresentaram as patologias, eczema meato nasal e erisipela, respectivamente. Não foi possível confirmar o diagnóstico em dois casos (AAS9 e RE9), pois os pacientes não retornaram com o resultado dos exames laboratoriais. Foram confirmados 47 casos de LTA pelos diferentes métodos de diagnóstico (TABELA 3).

**Tabela 3.** Frequência absoluta de LTA detectada por diferentes métodos de diagnóstico.

	Cultura <sup>a</sup>	Camundongo <sup>b</sup>	Histopatológico <sup>c</sup>	IRM <sup>d</sup>	IFI <sup>e</sup>
<b>Positivos</b>	07	04	21	29	12
<b>Negativos</b>	40	43	19	8	21
<b>Total<sup>f</sup></b>	47	47	40	37	33

Em 47 pacientes foram confirmados o diagnóstico de LTA por pelo menos um dos exames laboratoriais; <sup>a</sup> Observação de crescimento de parasito em meio Grace a partir do processamento de biópsias; <sup>b</sup> Observação do desenvolvimento de lesão na pata inoculada por macerado de biópsia; <sup>c</sup> Observação de amastigotas; <sup>d</sup> Intradermorreação de Montenegro (IRM) mensurada após 48 horas da injeção na intraderme de antígeno de *L. (L.) amazonensis* com diâmetro da induração maior que 5 mm; <sup>e</sup> Imunofluorescência indireta (IFI) com título maior ou igual a 40; <sup>f</sup> Total de pacientes confirmados o diagnóstico para LTA que foram submetidos ao método de diagnóstico especificado.



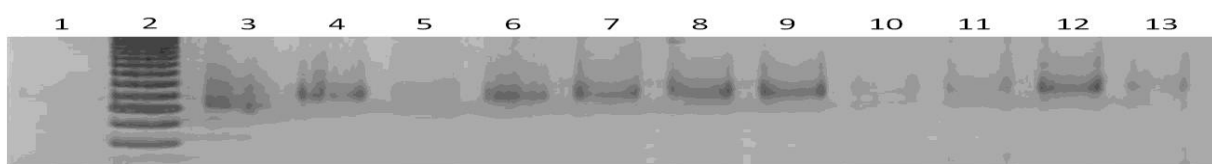
O exame histopatológico foi positivo, ou seja, foram observadas formas amastigotas de *Leishmania sp* em 21/40 casos confirmados de LTA. A IRM foi positiva em 29/37 dos casos confirmados, enquanto que, em apenas 12/33 dos casos confirmados a reação de IFI foi positiva.

Análises de correlação mostraram que não há correlação entre o número de lesões cutâneas e o alto valor da IRM, entretanto, quando correlacionados os resultados da IRM e o tempo de lesão observou-se alta correlação entre estes dados ( $p < 0,05$ ;  $r = 0,018$ ).

Foi possível o isolamento de parasitos em nove pacientes (DLP9, ILM9, JM9, ORN9, APA10, DAA10, GVN10, RCD10, SPC10), dentre estes sete foram isolados *ex vivo* (DLP9, JM9, ORN9, APA10, DAA10, GVN10, SPC10), dois foram isolado apenas *in vivo* (ILM9, RCD10) e dois foram isolados tanto *ex vivo* quanto *in vivo* (DLP9, ORN9). Os pacientes DAA10 e SPC10 apresentaram a cultura *in vitro* positiva, entretanto houve contaminação por leveduras e não foi possível estocar estes isolados no *Leishbank*.

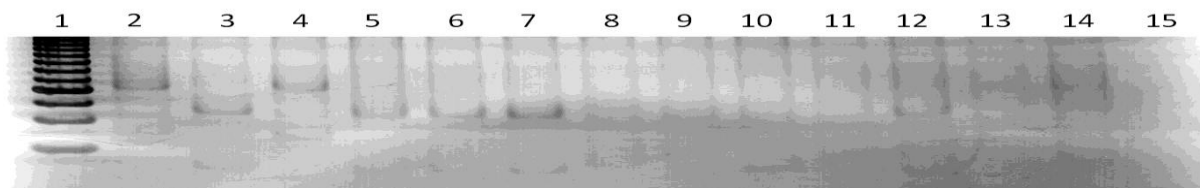
#### 4.3 Caracterização molecular dos subgêneros e espécies de *Leishmania*

Inicialmente foi extraído o DNA dos fragmentos de biópsias utilizando-se o kit de extração *illustra™blood genomicPrep Mini Spin Kit*. Após a reação de PCR observou-se a amplificação em 38 amostras. Foram observadas bandas amplificadas nítidas de fraca a alta intensidade na altura de 116/120 pares de bases (Fig. 1).



**Figura 1. Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores 150 e 152 em gel de poliacrilamida 8% corado pelo nitrato de prata.** Canaleta 1. Controle negativo; 2. Peso molecular 25 pb (Invitrogen); 3. *L. (L.) amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8); 4. *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); 5. JCS10; 6. NFS10; 7. AM10; 8. RCD10; 9. GCS10; 10. JVNJ10; 11. GVN10; 12. IAN10; 13. APA10.

Nas amostras positivas na PCR, no produto amplificado foi feito o tratamento com a endonuclease *Hae III* (PCR-RFLP). Comparando os fragmentos de DNA dos isolados com os das cepas de referência (M2903 e PH8), gerado pela digestão com *Hae III* observou-se que 36 amostras (95%) pertenciam ao subgênero *Leishmania (Viannia)* e duas amostras (5%) amostras foram caracterizadas como *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Fig. 2).



**Figura 2. Produtos da amplificação do kDNA por PCR após digestão pela enzima *HAE III* em gel de poliacrilamida 15% corado pelo nitrato de prata.** Canaleta 1. Peso molecular 25 pb (Invitrogen); 2. *L. (L.) amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8); 3. *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); 4. MAGA10; 5. JCS10; 6. NFS10; 7. APA10; 8. AM10; 9. RCD10; 10. IAN10; 11. KPS10; 12. ADS9; 13. BUSN10; 14. NPS9; 15. Controle negativo.

Nos pacientes com a forma cutânea foi identificada *Leishmania (Viannia)* em 93%. Nas duas amostras em que foi identificada *Leishmania (L.) amazonensis*, em uma (MAGA10) a paciente apresentava forma cutânea localizada e outro (NPS9) não foram informados dados sobre características da lesão. *Leishmania (Viannia)* foi identificada em 8/10 casos confirmados de pacientes com a forma mucosa de LTA.

#### 4.4 Comparação entre as sensibilidades dos testes de rotina e o diagnóstico molecular

A comparação entre as sensibilidades dos métodos convencionais de diagnóstico e a PCR foi feita a partir dos resultados dos exames laboratoriais obtidos dos prontuários dos pacientes atendidos no HDT. Estes resultados são mostrados na TABELA 4.

**Tabela 4.** Comparação entre a PCR e os métodos convencionais de diagnóstico para identificação de casos de LTA.

	PCR	Histopatológico	IRM	IFI	Cultura	Camundongo
Não-confirmados	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Confirmados	38/47 (81%)	21/40 (52,5%)	29/37 (78%)	12/33 (36%)	7/47 (15%)	4/47 (8,5%)

Os métodos de confirmação diagnóstica foram histopatológico, intradermoreação de Montenegro (IRM) e imunofluorescência indireta (IFI).

A PCR foi o método que apresentou maior sensibilidade (81%), seguido pelos seguintes métodos: IRM (78%), histopatológico (52,5%), IFI (36%), isolamento *in vitro* (15%) e isolamento *in vivo* (8,5%).

As análises estatísticas entre as sensibilidades do diagnóstico de rotina e a PCR mostraram que não houve diferença significativa entre a sensibilidade da PCR e IRM, entretanto as sensibilidades entre a PCR e o histopatológico, a IFI, o isolamento *in vitro* e o

isolamento *in vivo* foram estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ). Na forma mucosa da leishmaniose foi mais evidente o valor do diagnóstico feito através da PCR, de oito pacientes confirmados com LTA que realizaram o histopatológico apenas em um foi observada presença de formas amastigotas, a IFI apresentou resultado positivo em 1/7 casos, a IRM detectou todos os casos desta forma clínica e a PCR foi positiva em 8/10 casos confirmados.

## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi avaliada a contribuição do diagnóstico molecular através da PCR-RFLP para a confirmação da LTA. Foi realizada a PCR-RFLP em 51 amostras de pacientes de casos suspeitos de LTA atendidos no HDT em Goiânia, Goiás, a doença foi confirmada em 47 casos e destes em 38 foi possível a detecção do DNA do parasito em biópsias.

Os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com estudo feito por Santos et al. (2000) em que foi analisada a população de Corte de Pedra na Bahia, uma região de alta incidência de casos de leishmaniose, e verificou-se que a população mais afetada era a do gênero masculino e em idade produtiva, principalmente os que trabalhavam no campo. Estes dados sugerem que a transmissão preferencial da leishmânia é extradomiciliar, em indivíduos que apresentam exposição ocupacional ou proveniente de zonas rurais. A prevenção da LTA no extradomicílio em zonas rurais tem-se constituído um problema de difícil resolução, seja pela amplitude dos espaços a serem atuados, seja pela insuficiência de conhecimentos que a população tem sobre os criadouros dos insetos e das reais condições de transmissão dessa parasitose (SANTOS et al., 2000). O diagnóstico diferencial sempre deve ser considerado, uma vez que algumas doenças apresentam forma clínica semelhante às lesões causadas por *Leishmania sp.*

*Leishmania (Viannia)* foi o subgênero prevalente entre as amostras incluídas neste estudo (95%). Os resultados obtidos estão de acordo com os dados descritos por Oliveira et al. (2010) em que mostraram a prevalência de *L. (V.) braziliensis* no Estado de Goiás. Resultado similar foi obtido por CARVALHO et al. (2006) em um estudo feito no município de Cuiabá no Mato Grosso, em que de 68 casos confirmados de LTA, 64 (91,1%) eram de infecção causada por *L. (V.) braziliensis* e quatro (5,9%) de infecção causada por leishmânias do complexo *Leishmania mexicana*. Estudos em Minas Gerais feitos por VOLPINI et al. (2004) mostraram resultados similares, em um total de 66 amostras de casos confirmados 61 foram identificados como *L. (V.) braziliensis* enquanto apenas 5 foram identificados como *L. (L.)*

*amazonensis*. Os dados encontrados no presente trabalho demonstram que a espécie de *Leishmania* prevalente na região Centro-Oeste são espécies do complexo *Viannia*.

Oliveira et al. (2010) observou a IRM positiva em 58,8% dos casos de LTA, sendo que, o tempo de lesão foi entre 2 a 8 meses, exceto em um paciente que apresentava lesão há mais de dois anos. No presente trabalho não houve diferença estatística significativa entre os resultados da PCR e da IRM. A IRM foi positiva em 78% dos casos de LTA confirmada, acredita-se que a elevada positividade desta reação foi devido ao perfil dos pacientes atendidos no HDT, por ser um centro de referência em doenças tropicais no estado de Goiás e região Centro Oeste, são encaminhados pacientes que apresentam formas mais graves da doença. Os pacientes confirmados com LTA no presente estudo apresentavam de uma a 21 lesões e o tempo de lesão era de 15 dias a 20 anos. Nos pacientes com reação intradérmica positiva houve uma correlação positiva entre o tempo de lesão e o resultado da IRM. Esta reação não diferencia doença atual e pregressa, e normalmente continua positiva após o tratamento, sendo bastante útil em inquéritos epidemiológicos em áreas endêmicas. (GONTIGO; CARVALHO, 2003).

A taxa de isolamento *in vitro* e *in vivo* obtida no presente trabalho está abaixo daquelas relatadas por outros autores (GONTIJO; CARVALHO, 2003; OLIVEIRA et al., 2010). Estes resultados podem ser devido às contaminações freqüentes das culturas com fungos ou bactérias, ressaltando a importância do isolamento *in vivo* nos camundongos C57BL/6 IFN- $\gamma$ KO. Estes isolamentos mostraram-se úteis apenas para o estudo imunobiológico destes isolados, uma vez que a confirmação do diagnóstico por esse método demanda tempo e pessoal treinado.

A PCR apresentou alta sensibilidade comparada aos métodos convencionais de diagnóstico, apresentou-se positiva em 38/47 dos casos confirmados de LTA. No presente estudo, foram investigados os benefícios do uso da PCR para o diagnóstico da LTA, sugerimos que ela pode ser adicionada como método de diagnóstico de rotina para essa parasitose, pois apresenta várias vantagens tais como, alta sensibilidade, especificidade e rapidez, atualmente o diagnóstico por este método é mais rápido que os outros métodos convencionais (OLIVEIRA et al., 2003). Este resultado está de acordo com os estudos de diferentes trabalhos que utilizaram os mesmos ou diferentes primers (VOLPINI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; BERZUNZA-CRUZ et al., 2008). Nas últimas décadas muitos estudos têm relatado a eficácia da PCR-RFLP para o diagnóstico da LTA, pois ela é de fácil reprodutibilidade e permite a distinção dos subgêneros e espécies de *Leishmania*. Bacha et al. (2011) mostraram que se as amostras de lesões foram armazenadas e transportadas para um

laboratório de forma adequada o diagnóstico molecular apresenta resultados promissores para esta parasitose. No entanto, grandes obstáculos, tais como o custo e a necessidade de instalações especiais, devem ser superados para que esta abordagem possa ser amplamente aplicada em regiões endêmicas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A PCR-RFLP foi capaz de detectar o DNA de *Leishmania* sp. em amostras de pacientes com LTA, em 47 casos confirmados a PCR foi positiva em 38 (81%);

- Com este método foi possível a identificação do subgênero e espécies de *Leishmania*. Espécies pertencentes ao complexo *Viannia* foram prevalentes (95%) e *Leishmania (L.) amazonensis* foi identificada em 5% destes casos;

- A PCR-RFLP e a IRM apresentaram resultados similares. Quando comparada a PCR, o histopatológico, a IFI e os isolamentos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a PCR foi o método que apresentou maior sensibilidade.

- Foi encontrada correlação entre o tempo de lesão e a positividade na reação intradérmica.

**Apoio financeiro:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

## REFERÊNCIAS

BACHA, H. A.; TUON, F. F.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M.; OLIVEIRA, J.; NICODEMO, A. C.; QUIROGA, M. M.; MASCHERETTI, M.; BOULOS, M.; AMATO, V. S. *Leishmania (Viannia) braziliensis* identification by PCR in the state of Para, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 105, p. 173-178, 2011.

BARAK, E.; AMIN-SPECTOR, S.; GERLIAK, E.; GOYARD, S.; HOLLAND, N; ZILBERSTEIN, D. Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response. **Molecular & Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 141, p. 99-108, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Ministério da Saúde**, Brasília, 2007.

BRASIL. **Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana**, 2009. Disponível em: < [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31927](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31927) > Acesso em 16 de maio de 2011.

CARVALHO, M. L. R.; ANDRADE, A. S. R.; FONTES, C. J. F.; HUEB, M.; SILVA, S. O.; MELO, M. N. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 98, p. 277-285, 2006.

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

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, 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**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 463-469, 1994.

FLOETER-WINTER, L. M.; SHAW, J. J. New horizons in the identification and taxonomy of the *Leishmania* and the diagnoses of the leishmaniasis: the expansion of molecular techniques. **Research Advanced in Microbiology**, India, v 4, p. 63-79, 2004.

GARCIA, A. L.; KINDT, A.; QUISPE-TINTAYA, K. W.; BERMUDEZ, H.; LLANOS, A.; AREVALO, J.; BAÑULS, A. L.; DE DONCKER, S.; LE RAY, D.; DUJARDIN, J. C. American Tegumentary Leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 5, p. 109-116, 2005

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, Londres, v. 354, p. 1191-1199.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* (Cunha and Chagas) in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, Paris, v. 63(2), p. 134-145, 1988.

MAURER, M.; DONDJI, B.; STEBUT, E. V. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 198, p. 137-146, 2009.

MICROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, Mo., Mosby, v. 18, p. 1-14, 2010.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, Nova Iorque, v. 155, p. 335-350, 1987.

OLIVEIRA, J. G.; NOVAIS, F. O.; de OLIVEIRA, C. I.; da CRUZ JUNIOR, A. C.; CAMPOS, L. F.; da ROCHA, A. V.; BOAVENTURA, V.; NORONHA, A.; COSTA, J. M.; BARRAL, A. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 94, p. 55-59, 2005.

OLIVEIRA, M. A. P.; PIRES, A. S.; BASTOS, R. S.; LIMA, G. M. C. A.; PINTO, S. A.; PEREIRA, L. I. A.; PEREIRA, A. J. C. S.; ABRAHAMSOHN, I. A.; DORTA, M. L.; RIBEIRO-DIAS F. *Leishmania* spp. Parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 52, n. 2, p. 83-88, 2010.

PAIVA, B. R.; PASSOS, L. N.; FALQUETO, A.; MALAFRONTTE, R. S.; ANDRADE, H. F. Single step polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania (Viannia)* subgenus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 46(6), p. 335-338, 2004.

PASSOS, V. M.; LASMAR, E. B.; GONTIJO, C. M.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, p. 19-20, 1996.

ROMERO, G. A. S.; NORONHA, E. F.; PIRMEZ, C.; PIRES, F. E.; FERNANDES, O.; NEHME, N. S.; CUPOLILLO, E.; FIROOZMAND, L.; da GRACA, G. C.; VOLPINI, A.; SANTOS, S. L.; ROMANHA, A. J. Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for *Leishmania* detection using skin biopsy imprints on filter paper. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 109, p. 74-77, 2009.

ROSS, R. Notes on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, Londres, v. 14, p. 70-72, 1903.

SANTOS, J. B.; LAUAND, L.; SOUZA, G. S.; MACÊDO, V. O. Fatores sócio-econômicos e atitudes em relação à prevenção domiciliar da leishmaniose tegumentar americana, em uma área endêmica do sul da Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16(3), p. 701-708, 2000.

SHAHBAZI, F.; SHAHABI, S.; KAZEMI, B.; MOHEBALI, M.; ABADI, A. R.; ZARE, Z. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. **Parasitology Research**, Berlin, v. 103(5), p. 1159-1162, 2008.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; De CASTRO GOMES, C. M.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Inglaterra, v. 31, n. 8, p. 423-31, 2009.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GÜRTLER, R. E.; MCKERROW, J.; REED, S.; TARLETON, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 118, p. 1301-1310, 2008.

VELASQUEZ, L. G.; MEMBRIVE, N.; MEMBRIVE, U.; RODRIGUES, G.; REIS, N.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; TESSMANN, I. P. B.; SILVEIRA, T. G. V. PCR in the investigation of canine American tegumentary leishmaniasis in northwestern Paraná State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22(3), p. 571-578, 2006.

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**, Basel, v. 90, p. 31-37, 2004.