

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



KARINA PATRICIA BARACHO DE LIMA

Detecção de *Leishmania (Viannia) braziliensis* através de PCR convencional e qPCR em amostras de saliva de pacientes de região endêmica do estado de Pernambuco

Detecção de *Leishmania (Viannia) braziliensis* através de PCR convencional e qPCR em amostras de saliva de pacientes de região endêmica do estado de Pernambuco

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Bacharel, orientado pela Dra. Maria Edileuza Felinto de Brito e coorientada pela Dra. Juliana Figueirêdo da Costa Lima Suassuna Monteiro.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

L732d Lima, Karina Patricia Baracho de
Detecção de Leishmania (Viannia) braziliensis através de PCR convencional e qPCR em amostras de saliva de pacientes de região endêmica do Estado de Pernambuco / Karina Patricia Baracho de Lima. – 2019.
53f.: il.

Orientadora: Maria Edileuza Felinto de Brito.

Coorientadora: Juliana Figueirêdo da Costa Lima Suassuna Monteiro.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências anexo(s).

1. Leishmaniose 2. Doenças parasitárias 3. Diagnóstico de laboratório I. Brito, Maria Edileuza Felinto de, orient. II. Monteiro, Juliana Figueirêdo da Costa Lima Suassuna, coorient. III. Título

CDD 574

FOLHA DE APROVAÇÃO

Detecção de *Leishmania (Viannia) braziliensis* através de PCR convencional e qPCR em amostras de saliva de pacientes de região endêmica do estado de Pernambuco

KARINA PATRICIA BARACHO DE LIMA

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Bacharel. Defesa e aprovação em ____ de ____ de 2019

Dra. Maria Edileuza Felinto de Brito

Pesquisadora do Instituto Aggeu Magalhães- FIOCRUZ PE

Orientadora

Dra. Jaqueline Bianque de Oliveira

Professora da Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Bruna Santos Lima Figueiredo de Sá

Técnica em Saúde Pública do Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ PE

Dedico este trabalho aos meu amados avós que já não se encontram mais neste plano, a minha mãe por ser minha base e meu primeiro exemplo de educadora e ao meu pai pelo amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais por todo amor e confiança. Onde renunciaram a tantas conquistas próprias pra dar a mim e meu irmão a melhor educação possível.

Aos meus familiares, especialmente ao meu irmão Danilo e minha cunhada Juliana que nunca negaram ajuda quando eu precisei, em qualquer aspecto, sem esquecer da minha amável e agitada sobrinha Lorena.

A Wellyson Silva, companheiro e amigo, que jamais conseguirei expressar a enorme gratidão pelo apoio incondicional, pela confiança, cuidado, paciência e respeito. Amo você.

Aos colegas de turma da graduação e em especial aos amigos Eduarda, Bruna, Ariane, Ana Carolina e Myller pelo compartilhamento do desespero em provas, seminários e aulas, risadas no R.U e momentos de descontração.

A minha orientadora Dra Maria Edileuza F. de Brito pelos conselhos, críticas, amizade e apoio nestes anos. Muito mais que uma orientadora, uma amiga, uma fada madrinha. Só tenho a agradecer a excelente profissional que tive a honra de conhecer e pretendo levar como exemplo para o resto da vida.

As minhas coorientadoras Dra Juliana Figueirêdo e Dra Bruna Santos sempre gentis, atenciosas e nunca mediram esforços para me ajudar, gratidão eterna.

Ao acolhimento de todos os colegas do departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães, em especial a Rosineide pelas orações e palavras de conforto. Agradeço a Rafaela Lira pela amizade, cafés, conversas e risadas.

A os técnicos Andrea e Erika e Leonardo do Serviço de Referência em Leishmaniose do IAM por serem sempre disponíveis. Desculpem os pedidos frequentes.

Ao Instituto Aggeu Magalhães FIOCRUZ- PE e toda estruturas disponibilizada e contribuição para o meu crescimento profissional na área em que desejei seguir.

Em especial ao diretor Sinval Pinto Brandão filho pelo acolhimento na equipe e apoio nestes anos.

A todos os meus professores que grandemente contribuíram para o meu crescimento universitário, sempre me incentivando a buscar o melhor, aos que persistem e cumprem com louvor a difícil arte de ensinar, especialmente a Jaqueline Bianque de Oliveira, Emmanuel

Pontual, Valéria Wanderley Teixeira, Paula Braga, Caroline Miranda Biondi, meu sincero obrigado.

RESUMO

As leishmanioses são causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acometem pele e/ou mucosas e vísceras. Essas doenças são caracterizadas por apresentarem diferentes manifestações clínicas e epidemiológicas. A espécie de *L. (Viannia) braziliensis* (a principal encontrada em Pernambuco) pode causar desde a forma cutânea - evoluindo para cura espontânea; como a forma mucosa – que pode causar lesões desfigurantes da leishmaniose tegumentar americana (LTA). Os indivíduos participantes da pesquisa foram de ambos os sexos, com idades variadas, oriundos de diversos municípios Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. Os pacientes foram recrutados após anamnese a partir de demanda espontânea no serviço de dermatologia do Hospital Oswaldo Cruz e foram obtidas amostras de saliva através do método de coleta não invasiva. Essas foram transportadas ao Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ-PE, onde foram submetidas aos teste moleculares (PCR e qPCR). O alvo molecular utilizado foi o kDNA, *Leishmania (V.) braziliensis*. Além desse, foram feitos os testes convencionais utilizados para a identificação da doença (pesquisa direta e cultura). Do total de 41 amostras de fluido salivar, 26 apresentaram positividade em ambos os testes molecular para LTA. A coleta não invasiva, é um método sensível, prático e confortável ao paciente, permitindo a detecção e quantificação por PCR e qPCR do DNA de *Leishmania* spp. A saliva usada em técnica de diagnóstico, pode auxiliar a confirmação da LTA, visando o melhor prognóstico ao paciente.

Palavras-chave: Fluido salivar. Diagnóstico. Leishmaniose.

ABSTRACT

Leishmaniasis is caused by several protozoan species of the genus *Leishmania*, which affect the skin and or mucous membranes and viscera. These diseases are characterized by their clinical and epidemiological manifestations. The species of *L. (Viannia) braziliensis* (the main one found in Pernambuco) can cause a cutaneous form - evolving to spontaneous cure; as a mucosa formed by American tegumentary leishmaniasis (ACL). The research participants were from both sexes, with varied ages, coming from several regions of the Metropolitan Region of Recife, Pernambuco, Brazil. The patients were recruited after anamnesis from the need for technical and dermatological assistance at Oswaldo Cruz Hospital and where saliva samples were collected through the noninvasive collection method. These were transported to the Immunoparasitology Laboratory of the Immunology Department of the Aggeu Magalhães Institute - FIOCRUZ-PE, where they were submitted to molecular tests (PCR and qPCR). The molecular targeting was kDNA, specific for the diagnosis of *Leishmania (V.) braziliensis*. In addition, experimental tests were performed to identify the disease. From the total of 41 salivary solution samples, 26 showed positivity in both molecular tests for LTA. The noninvasive collection is a sensitive therapy, practical and comfortable to the patient, allowing detection and quantification by PCR and qPCR of *Leishmania* spp. DNA, the saliva utilized in the diagnostic technique may help in the confirmation of LTA, aiming at a better prognosis for patients.

Keywords: Salivary fluid. Diagnosis. Leishmaniasis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Status da endemicidade das leishmanioses cutâneas ao redor do mundo.....	20
Figura 2. Região de Moreno, área endêmica para LTA.	22
Figura 3. Ciclo biológico do gênero <i>Leishmania</i>	23
Figura 4. Lesão cutânea (A); Lesão Mucosa (B).....	25
Figura 5. Curva de diluição por eletroforese em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídeo, mostrando bandas específicas para <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> com limite de detecção de 10fg de DNA padrão.....	38
Figura 6. Visualização da amplificação dos produtos da PCR, utilizando os oligonucleotídeos LEIB1 e LEIB2 que amplificam os fragmentos de 750 pb em gel de agarose 1%.	39
Figura 7. Curvas de amplificação para diluições seriadas do DNA de <i>L. (V.) braziliensis</i>	39
Figura 8. Curva de melting com uma amostra de saliva positiva para <i>L. V. braziliensis</i> com pico de temperatura de 78,08°C (específico para essa espécie).....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínica, epidemiológica e laboratorial dos pacientes com lesões compatíveis com LTA.....	36
Tabela 2. Concordância entre pesquisa direta e testes moleculares.....	41
Tabela 3. Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes moleculares.....	41

ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ELISA- *Enzyme linked immunosorbent assay*

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IAM - Instituto Aggeu Magalhães

IDRM – Intradermoreação de Montenegro

LC – Leishmaniose Cutânea

LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada

LD – Leishmaniose Difusa

LM - Leishmaniose Mucosa

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

MS – Ministério da Saúde

NNN- Novy e McNeal modificado por Nicolle

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PD – Pesquisa direta

PE – Pernambuco

qPCR – PCR em Tempo Real

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

WB- *Western blotting*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
	Justificativa	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Geral.....	18
2.2	Específicos	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana.....	19
3.2	Agente etiológico da LTA	22
3.3	Ciclo biológico.....	23
3.4	Aspectos clínicos da LTA.....	24
3.5	Diagnóstico da LTA.....	25
3.6	Diagnóstico Molecular.....	28
3.7	Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	28
3.8	PCR em tempo real (qPCR).....	30
3.9	Métodos de coleta e substratos utilizados para o diagnóstico.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	Área de estudo	32
4.2	Amostras	32
4.3	Cultura <i>in vivo</i>	32
4.4	Extração de DNA.....	33
4.5	PCR convencional.....	33
4.6	PCR em tempo real	34
4.7	Teste Parasitológico	34
4.8	Definição de Caso	34
4.9	Análise dos dados	35

5	RESULTADOS	36
5.1	Curva de Diluição - PCR	38
5.2	Cultura <i>in vivo</i>	38
5.3	PCR Convencional.....	38
5.4	PCR em Tempo Real	39
5.5	Análise de Dados	40
6	DISCUSSÃO.....	42
7	CONCLUSÃO	46
8	REFERÊNCIAS	47
9	ANEXO 1.....	53

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são enfermidades de grande importância para saúde pública mundial, causadas por várias espécies de protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. São transmitidas entre os vertebrados pela picada das fêmeas infectadas de diversas espécies de flebotomíneos da ordem Díptera, gênero *Lutzomyia*, subgênero *Psychodopygus*, durante o repasto sanguíneo (SHAW; LAINSON, 1987). Compreendem um espectro de doenças que se diferenciam dependendo dos locais de ocorrência em função das variáveis relacionadas aos parasitos, vetores, ecossistemas, fatores ocupacionais, lazer e riscos individuais, em particular a infecção com HIV (SCHWARTZ, HATZ, BLUM, 2006).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença endêmica em algumas regiões do Brasil. O Estado de Pernambuco (PE) possui alguma dessas áreas endêmicas para LTA, tais como a Região Metropolitana da Capital Recife e a Zona da Mata (Norte e Sul) (RAMOS, 2011). A ocorrência de casos humanos normalmente ocorre em zonas rurais e há subnotificação de casos e diagnósticos tardios (TEMPONI et al, 2018).

Os métodos clássicos disponíveis como: pesquisa direta, cultura, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) entre outros para o diagnóstico da LTA não apresentam alta acurácia e, portanto, a clínica muitas vezes é soberana (GONTIJO et al ,2003). Sendo assim, para aumentar a eficácia na confirmação dos casos, é necessário avaliar a história epidemiológica (procedência), social (hábitos e profissão), aspectos clínicos (sinais e sintomas) e a confirmação laboratorial. Para a confirmação laboratorial dos casos podem ser realizados métodos parasitológicos (exame direto e cultura), imunológicos (Intradermoreação de Montenegro – IDRM; reação de imunofluorescência indireta – RIFI), testes imunoenzimáticos (*Enzyme linked immunosorbent assay*-ELISA e Western blotting - WB) e testes moleculares (BRITO et al., 2012).

Os métodos clássicos para diagnóstico envolvem coletas de tecido de lesão compatível com LTA, sendo essas invasivas e por vezes, dolorosas (GOTO; LINDOSO, 2010). A busca por novos métodos de diagnósticos em amostras não invasivas tem sido realizada na tentativa de minimizar os incômodos causados aos pacientes pelas técnicas convencionais, e ainda a diminuição de recursos e técnicos experientes na coleta que os métodos invasivos requerem. Portanto, a utilização de um procedimento não invasivo associado ao teste molecular assume grande importância para o diagnóstico. De acordo com Corvalan et al (2011) a capacidade e

velocidade de identificação de parasitos compreendem as principais vantagens das técnicas baseadas na detecção de DNA como a proposta em saliva. Com os avanços da biologia molecular houve o desenvolvimento e aprimoramento de diversas ferramentas para o auxílio na identificação de doenças, permitindo prognósticos e diagnósticos mais precisos (KAUNITZ, 2015).

Desta forma, os testes moleculares vêm sendo desenvolvidos com destaque para a técnica de Reação em cadeia da Polimerase, ou, do inglês, *Polymerase chain Reaction* (PCR). Sendo particularmente útil no caso da LTA, em decorrência da necessidade da confirmação parasitológica diante da possibilidade de tratamento. A PCR convencional é uma ferramenta muito valiosa que permite a identificação de espécies de *Leishmania* em casos sub clínicos da doença, ou de baixa carga parasitária (ANDRADE et al, 2008).

Já a PCR em tempo real (qPCR) é uma das ferramentas aprimoradas, dentre os métodos moleculares, para auxiliar no enfrentamento das doenças infecciosas. A qPCR destaca-se pela capacidade de quantificação, reprodução e rapidez nas amostras analisadas. Além das vantagens operacionais, é uma técnica bastante sensível e reprodutível podendo substituir a PCR convencional nas rotinas de diagnóstico laboratorial (PAIVA-CAVALCANTI, et al, 2010).

Nesse contexto, a utilização de um procedimento não invasivo assume grande importância para o diagnóstico da LTA. Propostas de coleta de amostras de saliva humana é um procedimento prático, rápido e não invasivo, não acarretando incômodo ao paciente.

Justificativa

Em Pernambuco as áreas de ocorrência da LTA estão em expansão, em consequência principalmente das modificações ambientais provocadas pelo homem, os deslocamentos populacionais originados de áreas endêmicas. O diagnóstico laboratorial da LTA emprega procedimentos invasivos para coleta de amostras que podem apresentar riscos de infecção secundária ao paciente e dificulta a operacionalização. A biópsia da borda da lesão apresenta limitação, uma vez que é realizada apenas por profissional médico em ambientes especiais para execução da técnica. Além disso, esse tipo de coleta pode ser mais difícil em crianças, principalmente em lesões de algumas áreas do corpo. Assim, o caráter grave e crônico da doença justifica o desenvolvimento de um método não invasivo para coleta de amostras para o diagnóstico, que proporcione o mínimo incômodo ao paciente e não apresente riscos de infecção no local.

O método proposto no nosso estudo permite a realização da coleta de amostras de maneira simples por um técnico qualificado de nível médio, e viabiliza o procedimento em locais de difícil acesso aos serviços de saúde. A proposta pretende introduzir o diagnóstico molecular com saliva, que conferem sensibilidades e especificidades na identificação do parasita. Trata-se de uma pesquisa relacionada à inovação tecnológica que poderá trazer benefícios substanciais aos pacientes. O método desenvolvido utilizando saliva associada aos testes moleculares poderá ser incorporado na rotina do Serviço de Referência em Leishmaniose do IAM/FIOCRUZ-PE e demais serviços de saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o desempenho do método de coleta não invasiva de saliva em pacientes suspeitos associado a técnicas moleculares e contribuir com os aspectos clínicos, epidemiológicos da LTA em Pernambuco.

2.2 Específicos

- Analisar o desempenho da saliva como o método de escolha para a coleta de amostras de pacientes com LTA;
- Comparar o desempenho de técnicas moleculares (PCR convencional e qPCR) utilizando o substrato da saliva no diagnóstico molecular da LTA;
- Comparar a concordância dos testes moleculares através do teste kappa;
- Análise dos aspectos clínicos e epidemiológicos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias causadas por protozoários. Relatos da leishmaniose cutânea foram descritos no primeiro século d.C. na Ásia Central. De acordo com a região, as leishmanioses possuem denominações características como: ferida de Balkh (cidade do Afeganistão), botão de Aleppo (Síria), botão de Bagdá (Irã). Cunningham, em 1885 fez a primeira observação do parasito do gênero *Leishmania* (FURTADO.,1994). Uma das primeiras alusões à LTA no Brasil é um documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, denominado “Antiguidadde la Syphilis en el Peru”, citado por Tello. Na cidade de Bauru em São Paulo durante a construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil houve casos da doença, onde se originou a denominação úlcera de Bauru. Gaspar Vianna, em 1911, nominou como *Leishmania brasiliensis* e introduziu o tártaro emético como terapia das leishmanioses em 1912, utilizada por muito tempo como a única droga no tratamento da leishmaniose tegumentar (NEVES *et al.*, 2011; COSTA, 2009).

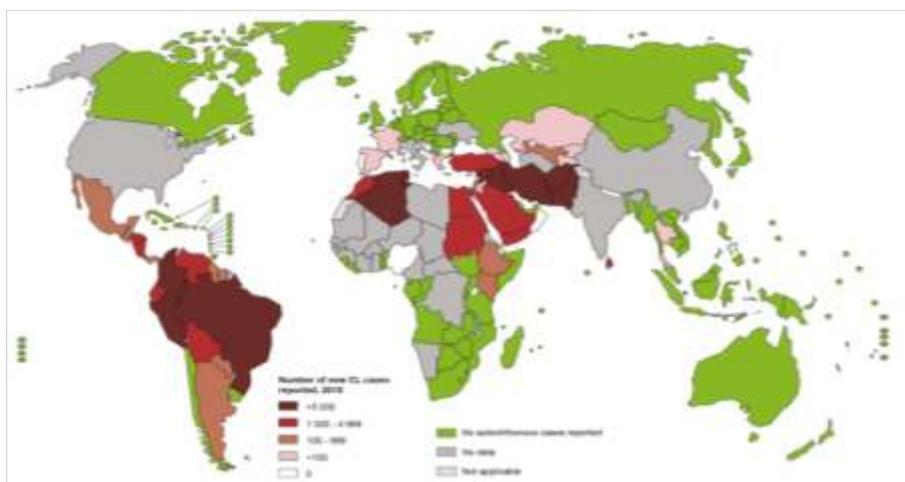
As leishmanioses são doenças negligenciadas de grande importância na saúde pública. Devido ao esquecimento nas discussões quanto às prioridades desta doença, isto resulta na sua complexidade epidemiológica e ecológica. Uma doença endêmica em 98 países, três territórios e cinco continentes, e que afeta 12 milhões de pessoas no mundo e outras 350 milhões estão sob risco de infecção. A leishmaniose cutânea (LC) é amplamente difundida, onde cerca de um terço dos casos ocorrem nas Américas, bacia do Mediterrâneo e Ásia ocidental do Oriente Médio para a Ásia Central, conforme observado na figura 1. Os países: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru são os dez países com mais casos e juntos são responsáveis de 70% a 75% da incidência global estimada do LC. (ALVAR *et al.*, 2012).

Com exceção do Chile e Uruguai, encontram-se registros da leishmaniose tegumentar desde o Continente Americano no extremo sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina. Nas Américas, o Brasil é considerado o país de maior prevalência deste agravo, tanto para a forma tegumentar quanto para a visceral. Doença de notificação compulsória do Ministério da Saúde (MS), com registros em todas as unidades federativas (NEVES *et al.*,2011).

Na região Nordeste do Brasil, a incidência da LTA é verificada nas áreas com resquícios de floresta da Mata Atlântica, que são propícias à colonização dos flebotomíneos, mamíferos silvestres e sinantrópicos. A principal espécie predominante no Nordeste é a *Leishmania braziliensis* que acomete mulheres, crianças e principalmente adultos do sexo masculino devido à atividade laboral geralmente próximo a região de mata (BRANDÃO-FILHO et al., 2003). No estado de Pernambuco este agente etiológico é a principal espécie do ciclo de transmissão nas áreas endêmicas da doença (BRITO et al., 2009).

Em Pernambuco, mais de 60% dos casos ocorrem na Zona da Mata, sendo em quase sua totalidade na forma cutânea localizada (LCL), com uma incidência média de 500 casos notificados anualmente (BRANDÃO-FILHO, 1999, 2001). Aspectos relacionados a eco epidemiologia da LT foram caracterizados e importantes contribuições referentes à identificação do protozoário, vetores e possíveis hospedeiros reservatórios foram encontradas na região (BRANDÃO-FILHO et al., 2003a, 2003b).

Figura 1. Status da endemicidade das leishmanioses cutâneas ao redor do mundo.



Fonte: World Health Organization, 2015

Várias espécies do subgênero *Viannia* e *Leishmania* têm importância médica no novo mundo como agente etiológico da LC. No Brasil, sete espécies do subgênero *Viannia* são descritas por como causadoras da LC: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L.(V.) shawi*, *L.(V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni* *L. (V.) lindendergi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (BRASIL, 2017).

Os flebotomíneos são os vetores da LTA e pertencem à Ordem *Díptera*, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gênero *Lutzomyia* no novo mundo e *Phlebotomus* – no velho mundo. De acordo com Dantas-Torres, et al. (2010), a fauna de flebotomíneos brasileiros é composta por mais de 230 espécies, simbolizando uma das mais bem estudadas faunas no mundo. As principais espécies envolvidas na transmissão da LTA no Brasil são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei*.

O protozoário causador da LTA foi isolado em diferentes vetores e em vários estados brasileiros. No Pará houve isolamento e caracterização do parasita em espécies de flebotomíneos, tais como *Lutzomyia complexa* e *Lutzomyia wellcomei*. Na Bahia, Ceará, Mato Grosso do Sul, Paraná e Pernambuco o principal vetor da *Leishmania braziliensis* é o *Lutzomyia whitmani*, e nos estados São Paulo e Minas Gerais, o *Lutzomyia intermedia* (BRASIL, 2017).

A infecção pelo gênero *Leishmania* foi descrita em animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos, equídeos). Já foram registrados como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais espécies de roedores como: *Necromys (sin=Bolomys) lasiurus*, *Rattus rattus* e *Nectomys squamipe* (BRANDÃO et al., 2003).

O Brasil vem apresentando mudanças nas últimas décadas quanto ao comportamento da LTA. Ela era considerada uma zoonose silvestre e ocasionalmente de indivíduos que tinham contato com áreas florestais onde se infectavam. Passaram também a ocorrer casos em zonas rurais degradadas, devido ao desmatamento, e periurbanas por serem áreas de colonização antiga. De 1995 a 2014 foram registrados 25.763 casos, sendo em 2003 confirmados casos autóctones em todas as Unidades federativas do País. De todas as regiões três possuem uma maior incidência, são elas: Norte, registrando 10.367 em 2014; Nordeste, com 4.969 e Centro-Oeste, com 3.038 (BRASIL, 2017).

Segundo o MS, atualmente admite-se a ocorrência de três padrões epidemiológicos distintos da LTA, que compreendem: 1) perfil silvestre - determinado como o ambiente de floresta primária, onde o ciclo de transmissão ocorre em animais silvestres e esporadicamente em humanos que tem contato com regiões de floresta; 2) perfil ocupacional ou lazer - esse está relacionado à degradação das áreas de vegetação, exploração e ecoturismo, extração de madeira, construção de estradas; 3) perfil rural ou periurbano - está associado a migração e ao processo de desmatamento existente entre o ambiente urbano e rural caracterizando o rural-periurbano. De maior predominância, há o ambiente peridoméstico e doméstico com a

adaptação dos vetores e presença de hospedeiros reservatórios secundários o que favorece a transmissão (BRASIL, 2007; DESJEUX, 2001). A figura 2 ilustra o perfil 3 de região endêmica.

A LTA, relacionada à *L. (V.) braziliensis*, apresenta diferentes padrões regionais, da Amazônia ao Sudeste do Brasil, referentes aos vetores, possíveis reservatórios e perfil eco epidemiológico (BRANDÃO-FILHO, 2001; MARZOCHI, 1994; SHAW; LAINSON, 1987).

Figura 2. Região do Município de Moreno-PE, área endêmica para LTA.



Fonte: Brito, MEF, 2010.

3.2 Agente etiológico da LTA

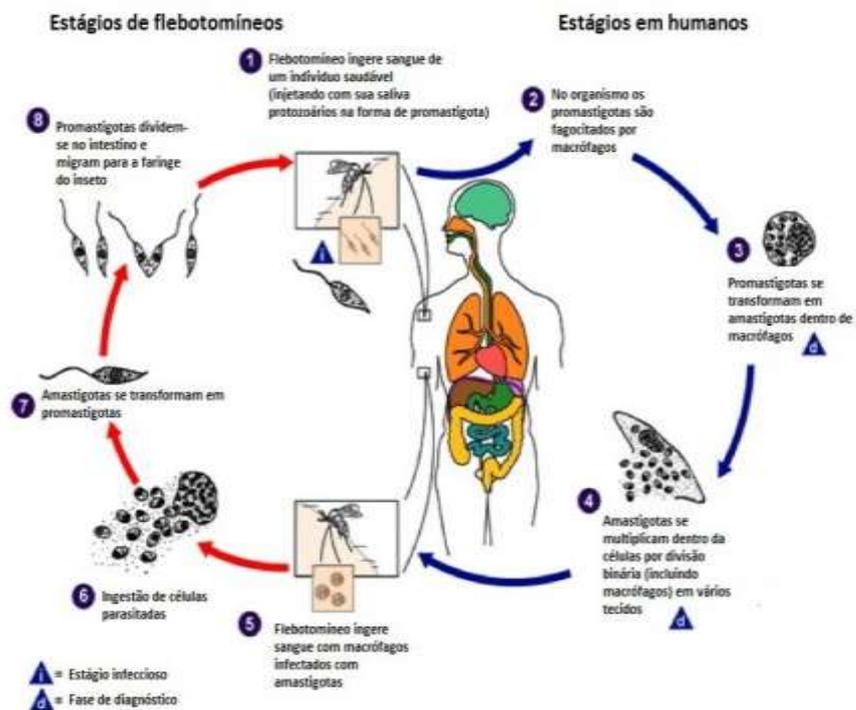
Das sete espécies existentes, a *Leishmania (V.) braziliensis* representa uma população geneticamente diversificada (BRITO *et al.*, 2009). Estudos demonstram que é o agente etiológico mais difundido não só no Brasil como em toda América Latina, ocorre desde a América Central até o Norte da Argentina. Foi a primeira espécie de *Leishmania* incriminada como agente etiológico da LTA no país e única em Pernambuco (BRASIL, 2007; BRITO *et al.*, 2008;2009; 2012).

É característica da espécie *L. braziliensis* apresentar poucos parasitos nas lesões, e as principais manifestações clínicas da LC são caracterizados por lesões unicamente na pele a partir da inoculação das formas promastigotas nesta região por um vetor. A lesão primária geralmente é única, exceto quando há disseminação ou várias inoculações por flebotomíneos (BRITO *et al.*,2012).

3.3 Ciclo biológico

Os parasitas do gênero *Leishmania* são heteroxenos e apresentam em seu ciclo de vida a forma evolutiva flagelada e extracelular (promastigota) e a aflagelada e intracelular (amastigota). Nos mamíferos as formas amastigotas ocorrem em macrófagos da pele ou de vísceras, onde se reproduzem por divisão binária. Os macrófagos fagocitam rapidamente os promastigotas quando os encontram livres no meio intersticial, mas não conseguem destruí-los constituindo a forma amastigota. Quando o inseto vetor faz o repasto sanguíneo no indivíduo ou o animal parasitado, irá retirar as leishmanias, que passarão a evoluir no interior de seu tubo digestivo. As formas amastigotas tomam-se alongadas e seus flagelos crescem, passando os parasitos a promastigotas e retornando ao ciclo. A grande multiplicação parasitária na região pilórica pode vir a dificultar a ingestão de sangue pelo vetor, quando ele tentar de novo alimentar-se. O inseto faminto, eventualmente passa a atacar muitas pessoas ou animais (REY, 2010). Como descrito na figura 3.

Figura 3. Ciclo do biológico do gênero *Leishmania*



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention – CDC, 2017.

3.4 Aspectos clínicos da LTA

A LTA apresenta diversas manifestações clínicas, são elas: a localizada, cutânea disseminada, a difusa e a mucosa. A depender da forma clínica apresentada, a doença vai ser mais ou menos grave.

Dentre as formas clínicas destaca-se a localizada, que apresenta bordas das lesões elevadas e endurecidas, com tamanho variável de 1 a 10 mm de diâmetro demonstrando um tecido granulomatoso ao fundo com regiões esbranquiçadas e periféricas rosa. As lesões são indolores, porém podem ocorrer infecções secundárias (em geral por bactérias) deixando a região dolorosa. As úlceras podem durar de 3 a 5 meses ou até mesmo de 15 a 20 anos. Podendo evoluir para cura espontânea, em um período de 6 a 15 meses (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). Caso não haja tratamento adequado pode haver metástase e o aparecimento de lesões mucosas.

Além dessas formas, existe cutânea disseminada, que se caracteriza por apresentar lesões papulares do tipo acneiforme distribuídas por várias regiões do corpo (COSTA, 2009). Outra forma cutânea é a recidiva cútis com desenvolvimento de lesões satélites próximas a cicatriz, após tratamento. Esse tipo de lesão está relacionado à imunidade do hospedeiro e ou a persistência parasitária nas infecções por *L. braziliensis* (MENDONÇA *et al.*, 2004; GOTO *et al.*, 2010).

Outra forma menos comum é a leishmaniose Difusa (LD), esta forma é caracterizada por ser anérgica, ou seja, não há resposta imune ao antígeno parasitário. Vias como sangue e linfa contribuem para a disseminação dos parasitas causando infiltradas, placas verrucosas e nodulares. Sintomas como: Mal estar, febre, linfedema e aumento dos nódulos linfático são observados. As lesões chegam a afetar a maior parte da pele (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

A forma clínica mais severa é a leishmaniose mucosa (LM). Também conhecida como espúndia é de difícil tratamento podendo levar a morte do indivíduo. O parasita possui a capacidade de migrar para tecidos mucosos por vias linfáticas ou hematogênica, apresentando deformidades que normalmente se iniciam por uma inflamação nasal, seguidos de ulcerações até perfuração do septo. Outras regiões mucosas podem ser afetadas como a oral (lábios e bochechas) caracterizando a forma mucosa grave. São raros os casos que podem levar a problemas no tecido ósseo, mas pode ocorrer por sucessivas lesões cutâneas. O

comprometimento da mucosa pode surgir ainda com lesões cutâneas presentes e até anos após sua cicatrização. Não ocorre cicatrização espontânea e é comumente associada a infecções secundárias (REITHINGER *et al.*, 2007).

Figura 4. Lesão cutânea (A); Lesão Mucosa (B).



Fonte: Brito, M.E.F , 2013.

3.5 Diagnóstico da LTA

O diagnóstico da LTA é baseado em características clínicas através da anamnese das lesões observadas, dados epidemiológicos (indivíduos de área endêmica ou se houve deslocamento para estas áreas recentemente) e o diagnóstico complementar através dos testes laboratoriais (COSTA *et al.*, 2009). A resposta clínica é determinada por uma complexa interação entre vetor, espécie infectante e resposta imunológica. A forma cutânea localizada (LC) e muco-cutânea (LM) da LT representam o polo responsivo e a difusa (LCD) o não responsivo, por não apresentar resposta imune ao antígeno do parasito, este vasto polimorfismo das manifestações clínicas que dificulta sua confirmação (ANDRADE *et al.*, 2008).

Inicialmente para um diagnóstico mais preciso é indicado descartar outras doenças que possuem semelhanças clínicas com a LTA através do diagnóstico diferencial. Para a forma cutânea é necessário à distinção de úlcera tropical, úlceras de membros inferiores, úlceras traumáticas, piodermites, neoplasias cutâneas, anemia falciforme, paracoccidiodomicose, sífilis e tuberculose cutânea. Deverá ser excluída a hanseníase virchowiana no diagnóstico diferencial da leishmaniose cutânea difusa. Para a manifestação mucosa é aconselhado à distinção da paracoccidiodomicose, rinoscleroma, boubá, sífilis terciária, hanseníase

virchowiana, granuloma médio facial e neoplasias. Para distinção da forma vegetante da LC o diagnóstico diferencial de manifestações verrucosas, esporotricose verrucosa, cromomicose, paracoccidioidomicose, piodermite, vegetante e tuberculose verrucosa (FREEMAN, 1983).

Devido ao espectro das apresentações clínicas, o diagnóstico clínico-epidemiológico deve ser complementado, sempre que possível, por métodos laboratoriais. O diagnóstico da LTA apresenta limitação a qual está relacionado a coleta de amostras nos pacientes para os exames laboratoriais (Phumee *et al.*, 2013) Em geral a obtenção de material das lesões é feita por métodos invasivos como a biópsia, escarificação, punção aspirativa da borda da lesão, que causam desconforto e são particularmente de difícil execução em crianças e em partes delicadas do corpo do paciente. Procedimentos como a biópsia exigem técnicos especializados e pode ser feita apenas por especialista em ambiente hospitalar, e ainda pode aumentar o risco de infecções secundárias por bactérias (COSTA *et al.*, 2009).

Métodos alternativos para coleta de amostras biológicas para o diagnóstico de LTA têm sido pesquisado com o objetivo de proporcionar maior conforto aos pacientes. Na literatura já foram descritas que em amostras de tecido, sangue, urina, fezes e esfregaços de secreções nasais e orais humanas é possível a detecção do agente etiológico da LV, entretanto, é escasso registros da detecção da (LCA) nos fluidos orais. (VALENCIA *et al.*, 2012). O método por fluido salivar é uma alternativa válida para o diagnóstico de Leishmaniose, podendo ser aplicado em situações de trabalho de campo, por exemplo, que requer uma coleta rápida e de fácil manuseio, ou ainda em pediatria. Além disto, por ser um fluido orgânico dispensando em um recipiente estéril a obtenção é de baixo custo e em termos de biossegurança é praticamente inexistente, como descrito por (FORKNER *et al* 1934; CORVALAN *et al*, 2011).

A *L. (V.) braziliensis* que é o agente causador da LTA foi à única espécie identificada em saliva através de PCR e a pioneira isolada do fluido salivar nas áreas endêmicas de Pernambuco (BRITO *et al.*, 1993; 2009; 2012). Uma análise realizada por Alexandre (2015) em saliva verificou a presença de *Leishmania (V.)* spp. em 25% (10/40) das amostras utilizando PCR convencional e através de qPCR verificou-se a presença de *Leishmania (V.)* spp. em 90% (36/40) das amostras. Existem poucos relatos na literatura sobre o tema em pauta, possivelmente será devido ao tropismo da espécie e ao complexo da doença. A detecção do

DNA de *Leishmania* na saliva poderá atuar como uma opção na investigação parasitológica (CORVALAN *et al.*, 2011).

O diagnóstico laboratorial definitivo se dá pela visualização do parasito em espécimes clínicos através das técnicas diretas e indiretas. A visualização do agente é reconhecido como *Gold Standard* (padrão ouro), e o primeiro teste que deve ser avaliado para LTA no Brasil de acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2007). É feita através de escarificação, aspiração ou biópsia da borda de lesão e corados com Giemsa, Wright, Leishman ou Feulgen, em seguida feita a observação das formas amastigotas. A positividade é inversamente proporcional à duração da infecção, para casos em que o agente etiológico é a *L. braziliensis* a sensibilidade se mostra em torno de 100% nos dois primeiros meses, 75% aos seis meses e 20% acima dos 12 meses. Esta técnica não identifica espécie, que é importante para um prognóstico e terapia a ser utilizada (ANDRADE *et al.*, 2008; FURTADO, 1980)

O isolamento em meio de cultura é considerado o método mais específico no diagnóstico, o isolamento o meio de cultura mais utilizado é o ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle - NNN. O parasito cresce adequadamente em temperatura ambiente (24° a 26°C) e a sensibilidade da técnica para *L. braziliensis* está em torno de 50%. (FREEMAN, 1983). A inoculação preferencialmente em Hamsters (*Mesocricetus auratus*) por material de biópsia cutânea é outra forma de diagnóstico parasitológico. Ambos os métodos necessitam de pessoal treinado, contudo demoram a um resultado (cultura cerca de 10 dias e inoculação em modelo animal de 2 a 9 meses para evolução da lesão) e casos crônicos possuem uma baixa carga parasitária, sendo mais utilizados em centros de pesquisa (FURTADO, 1980).

Para o diagnóstico imunológico uma das técnicas mais utilizadas é a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) que detecta uma hipersensibilidade tardia através da resposta celular. Consiste na inoculação de antígenos na derme do paciente e após 48 a 72 horas ocorre uma reação. A sensibilidade da técnica varia entre 86% a 100%, porém como é realizado um coquetel de antígenos há uma diminuição considerável da especificidade devido a reações cruzadas. Este método possui particularidades, uma delas é a positividade observadas somente após 4 meses da infecção, não há distinção de infecções presentes e passadas e a negatividade da forma difusa e em pacientes imunossuprimidos. Para valores preditivos é um teste a ser considerado (ANDRADE *et al.*, 2008)

O método de ELISA (*Linked Immunosorbent Assay*), imunofluorescência indireta (IFI) e *Western blot* são os mais citados em trabalhos, onde o ELISA e IFI apresentam sensibilidade que variam entre 70 - 90% e o terceiro de até 100%, porém são bastantes complexos e possuem elevado custo (CERUTTI *et al.*, 2017). Um dos fatores a serem considerados nos métodos sorológicos é a reatividade cruzada, no caso da leishmaniose pode haver com protozoários da família *Tripanossomatidae*, como o *T. cruzi* causador da doença de chagas o que diminui a especificidade do teste (BRITO *et al.*, 2000; LUCIANO *et al.*, 2009). Outro fator é o fato de nos primeiros três meses da infecção geralmente obtém-se resultados negativos, principalmente para aqueles que possuem a forma difusa e nos imunossuprimidos (ANDRADE *et al.*, 2008). Antígenos têm sido estudados para o aumento da sensibilidade e diminuição da reação cruzada (DUARTE *et al.*, 2015). Além disso, o acompanhamento dos títulos de IgM e IgG é realizado através desses para observar a cura clínica (BRITO *et al.*, 2001; FAGUNDES SILVA *et al.*, 2015).

3.6 Diagnóstico Molecular

Métodos moleculares também são relevantes já que permitem a detecção de DNA do parasito mesmo quando há baixa carga parasitária, já os testes sorológicos são pouco utilizados devido a pequena produção de anticorpos na LT. A utilização de métodos de diagnóstico laboratorial visa não somente à confirmação dos achados clínicos, mas pode fornecer importantes informações epidemiológicas, como a identificação da espécie de *Leishmania* circulante na região (KUBISTA *et al.*, 2006).

3.7 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

As técnicas moleculares atualmente são utilizadas em diversos aspectos. Em laboratório de pesquisas é bastante utilizado na clonagem genética, sequenciamento, medição da expressão gênica e uma infinidade de outros usos. Na medicina, pode fazer a identificação precisa de microorganismos, sejam patógenos individuais ou uma população de diversos organismos. A PCR também é utilizada para identificação de DNA humano para mutações e polimorfismos e ainda tipificar tecidos e sangue. Outras aplicações como o DNA *fingerprinting*, baseado em PCR, foi um dos maiores avanços na análise forense nos últimos 50 anos. Além disto, revolucionou o campo da paleontologia molecular, já que o DNA pode ser sequenciado de espécimes secos ou fossilizado a milhares ou mesmo milhões de anos (KAUNITZ, 2015). A

técnica é altamente sensível e robusta baseada na DNA polimerase, uma enzima usada para amplificar uma porção de DNA in vitro. Esta capacidade essencial de produzir cópias perfeitas de material biológico atribui ao método um diferencial imensurável (POORNIMA, 2016).

É um método amplamente utilizado para diagnóstico das leishmanioses como também para identificação de espécies, de alta sensibilidade, reprodutibilidade e rapidez quando comparada aos testes tradicionais de pesquisa direta (PD) e cultura (RODRIGUES et al., 2000). Ela baseia-se na amplificação em escala exponencial das sequências do fragmento de DNA alvo. A expansão da técnica de biologia molecular melhorou significativamente o diagnóstico da LTA em Pernambuco e em outros lugares no Brasil. Para os subgêneros *Viannia* e *Leishmania* revelaram sensibilidade de 95,5% e 88,2%, respectivamente, e 100% de especificidade para amostras individuais saudáveis, revelando-se mais eficiente que os exames convencionais (BRITO et al., 2012).

A PCR foi originalmente desenvolvida por Kary Mullis e colaboradores em meados dos anos 80 pelo qual ele recebeu o prêmio Nobel de Química em 1993. A PCR se caracteriza por amplificar em processos cíclicos sequências de ácidos nucleicos, gerando um grande número de cópias que estão prontas para análise. Para isto, é essencial a utilização de reagentes como a solução tampão, $MgCl_2^+$, dNTPs, oligonucleotídeos, DNA polimerase e a adição de água destilada. Estes reagentes em conjunto são submetidos aos repetidos ciclos e variações de temperatura havendo desnaturação, anelamento dos oligonucleotídeos e extensão que culmina na amplificação do DNA (KUBISTA, 2006; POORNIMA, 2016).

Estudos realizados através de técnicas moleculares demonstraram que a PCR amplifica o cinetoplasto, uma organela exclusiva dos cinetoplastídeos que contém aproximadamente 10.000 pequenos DNAs circulantes, conhecidos como minicírculos de DNA (kDNA). Os minicírculos possuem um tamanho entre 600 e 800 pb em membros do gênero *Leishmania* (RODRIGUES et al, 2000). Ocorrem variações do método de PCR, como por exemplo, a RT-PCR e a PCR em tempo Real (WINTER, 2005).

3.8 PCR em tempo real (qPCR)

A PCR em tempo real surgiu em 1992 por Higuchi et al. (1993) para suprir necessidades da PCR convencional devido a limitações da técnica nos quesitos de amplificação de DNA e análise do produto (KUBISTA, 2006). O mecanismo da qPCR é semelhante ao da técnica da PCR convencional diferindo essencialmente numa característica inovadora: a possibilidade de quantificar o DNA em tempo real, podendo ser observada ciclo a ciclo. As fases de amplificação, detecção e quantificação são totalmente automatizadas (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Outra vantagem do sistema de qPCR é que não é necessária uma segunda etapa para visualização dos fragmentos de DNA amplificados, como acontece na PCR convencional. Essas etapas de visualização podem ser, principalmente, por eletroforese em gel de agarose ou por placas de microtitulação de ELISA. Portanto, a qPCR, com uma etapa a menos, é mais rápida que a PCR convencional (KUBISTA *et al.*, 2006).

O sistema é baseado no uso de corantes e sondas fluorescentes que fazem o acompanhamento durante a amplificação. O SYBR Green I e TaqMan são os sistemas mais empregados para gerar fluorescência. O SYBR é um corante que se liga não especificamente as fitas duplas de DNA geradas durante a amplificação. A TaqMan utiliza uma sonda direcionada para a região específica interna que necessita ser amplificada, ao qual ocorre emissão de luz quando há sua degradação na reação (PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2010). A análise de emissão de luz é feita por um detector de sinal luminoso que cria um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo da PCR, o sinal gerado reflete a quantidade de produto formado (KUBISCA, 2006). Durante os ciclos o limiar *threshold* (Ct) é o ponto de corte gerado definindo o limite negativo e positivo das amostras. Os resultados são obtidos através de gráficos computacionais interconectados gerados no termociclador durante a reação. Nos gráficos quatro parâmetros são analisados: curva de amplificação, curva de dissociação, espectro e componente. Controles positivos e negativos devem ser incluídos em todas as reações (PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2010).

No sistema Sybr green, um artifício que garante a especificidade de detecção é a obtenção da curva de dissociação dos oligonucleotídeos, também denominada como curva de *melting* (HRM – *high resolution melting*). Através da curva de *melting*, pode-se determinar o ponto correspondente à dissociação das cadeias de DNA, a temperatura à qual 50% do DNA é desnaturado. O pico na curva de *melting* é essencial para verificar se houve formação de um

único produto, se foram formados produtos inespecíficos ou eventuais dímeros de oligonucleotídeos (NASCIMENTO et al 2010).

As aplicações da PCR em tempo real são inúmeras como, por exemplo: o perfilamento genético ou “*microarray*” que permite a análise de vários genes ao mesmo tempo, identificação de polimorfismos de nucleotídeos, genotipagem e discriminação alélica, detecção de translocações cromossômicas e na farmacogenética (NASCIMENTO *et al.*, 2010).

Um trabalho realizado por Paiva-Cavalcanti et al. (2013) desenvolveu dois ensaios de qPCR para a detecção de *L. (V.) braziliensis* em amostras de sangue de animais e houve positividade em 43,9%. Além disso, avaliou a eficiência desses ensaios utilizando amostras de pele de pacientes humanos com suspeita da infecção, obtendo uma positividade de 46,2 %. Ambos os protocolos desenvolvidos têm o potencial de ser aplicado no diagnóstico de LTA em animais e humanos em áreas endêmicas, fornecendo uma ferramenta rápida e precisa.

3.9 Métodos de coleta e substratos utilizados para o diagnóstico

Os principais procedimentos utilizados para o diagnóstico da LTA são biópsia cutânea, punção aspirativa e escarificação. A biópsia cutânea é realizada com o uso de lâmina de bisturi, ou com o auxílio de punch, e pode ser utilizada para confecção de esfregaço em lâmina, cortes histológicos, inoculações em animais ou em meios de cultura, e ainda em técnicas moleculares. (SIRIYASATIEN *et al.*, 2016) A punção aspirativa é realizada após injeção de solução salina estéril na borda da lesão ou linfonodo, utilizando-se uma seringa, e a escarificação é feita na borda interna da úlcera ou da superfície de lesão fechada, utilizando-se lâminas de bisturi estéreis ou estilete. Para os exames imunológicos e sorológicos é utilizado o sangue, que também é destinado ao desenvolvimento de testes moleculares (BRASIL, 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O estudo foi desenvolvido a partir de pacientes suspeitos de LTA que procuraram o ambulatório do Hospital Oswaldo Cruz da cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. Desses, 41 foram recrutados para serem incluídos neste estudo e os referidos pacientes foram examinados pela médica dermatologista do serviço. Os pacientes foram oriundos dos municípios: Paulista, Jaboatão dos Guararapes, Paudalho, Goiânia, Moreno, Escada, Itamaracá, Cabo de Santo Agostinho, Jaboatão dos Guararapes, Prazeres e bezerros, áreas endêmicas para LTA.

Antes da coleta de amostra, os pacientes foram instruídos sobre a pesquisa e solicitados a assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido, disponível no anexo 1, aprovado pelo Comitê de Ética do IAM/FIOCRUZ-PE (IAM), sob o No. 038/11. Os critérios utilizados para inclusão no estudo incorporaram pacientes que além de atenderem a critérios clínico-epidemiológicos, apresentavam lesões ativas. Foram excluídos pacientes diagnosticados com outra doença dermatológica.

4.2 Amostras

O fluido salivar foi dispensado dentro de um coletor de 80 ml estéril, a amostra biológica foi transportada sob-refrigeração. Parte da amostra foi inoculada em hamster (cultura *in vivo*) e parte foi armazenada para extração de DNA, na temperatura de -20°C no Laboratório de Imunoparasitologia (LIMP) do Departamento de Imunologia do IAM-FIOCRUZ-PE para realização dos testes moleculares.

4.3 Cultura *in vivo*

Amostra de 50 μl de fluido salivar foram inoculada em hamster pela via intraperitoneal no SRL-IAM. Os animais ficaram em observação durante 3 (três) meses no biotério experimental do IAM/Fiocruz-PE após esse período os hamsters foram anestesiados e eutanasiados para a retirada de fragmentos de baço e fígado, que foram macerados em solução de penicilina/estreptomicina, adicionados em tubo de meio NNN modificado, acondicionados em estufa incubadora (BOD) a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e a cultura era observada a partir de cinco dias. O trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) sob o número

4.4 Extração de DNA

O DNA de *Leishmania* foi extraído seguindo o protocolo de adsorção à sílica em suspensão proposto por (DA SILVA, 2017). Em cada 30 μL da amostra contendo até 5 μg de DNA foram acrescentados 75 μL de NaI 6 M. Adicionou-se à 5 μL da solução de suspensão em sílica e o tubo foi agitado em vortex durante um minuto e deixado em repouso no gelo por 4 minutos. Posteriormente, centrifuga-se a 15.800 x g por 30 segundos e na sequência o sobrenadante é removido. Adiciona-se 700 μL da solução de lavagem gelada (etanol 50%, NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 1 mM pH 7,5), sendo repetida três vezes. O sedimento é ressuspensão em 10 μL de água tipo I autoclavada. A solução envolvendo o DNA é incubada durante 5 minutos a 45 °C e após centrifugado a 15.800 x g por 30 segundos. Após esta etapa, o sobrenadante contendo DNA foi transferido para outro tubo e estocado a -20 °C.

Um microlitro (1 μL) de cada amostra purificada foi utilizada para a quantificação do DNA genômico, utilizando o Nanodrop 2000 *Thermo Scientific*®, para avaliação do grau de pureza e concentração adequada à PCR.

Avaliou-se a sensibilidade de detecção de DNA de *Leishmania (Viannia)* sp. Foi utilizado o DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis* da cepa de referência (IOC-566-MHOM/BR/75/M2903) diluídas em séries nas concentrações de DNA: 10ng/ μL , 1ng/ μL , 10pg/ μL , 1pg/ μL , 100fg/ μL , 10fg/ μL e 1fg/ μL).

4.5 PCR convencional

O DNA contido nas amostras de saliva foi submetido à amplificação em um termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf). Utilizou-se oligonucleotídeos iniciadores específicos que permitem à amplificação do kDNA de *Leishmania* pertencente ao subgênero *Viannia* LEIB1 (5'-GGGTTGGTGTAATATAGTGG-3') e LEIB2(5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG - 3') tendo como alvo de detecção o kDNA do parasito, equivalente a 750 pb, de acordo com as condições descritas por De Bruijn e Barker (1992).

A PCR foi realizada em um volume final de 25 μL contendo Tris - HCl (10 mM), KCl (50 mM), MgCl₂ (1,5 mM), dNTP (0,2 mM), 25 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores e 2,5 μ da enzima Taq DNA Polimerase. A essa mistura foram adicionados dois microlitros da amostra de DNA a ser analisada (concentração). A amplificação constituiu - se de 35 ciclos e as etapas foram de: 94°C (1 min), 65°C (1 min) e 72°C (1 min) (ERESH; McCALLUM; BARKER, 1994), precedidos de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C.

Um controle negativo (sem DNA) foi adicionado à reação, juntamente a dois controles positivos (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de DNA genômico de *L. (V.) braziliensis*, cepa de referência (IOC-L-566-MHOM/BR/75/M2903).

Dez microlitros dos produtos da PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,0 %, corados pelo brometo de etídeo a 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e visualizados em um transluminador de luz ultravioleta e fotografadas com o sistema Kodak[®], modelo *Gel Logic 100 Imagem System*.

4.6 PCR em tempo real

As amostras de DNA foram submetidas à técnica de quantificação por PCR em tempo real (qPCR), conforme descrito por Paiva-Cavalcanti (2013). Este sistema utiliza o kDNA como alvo de detecção à região conservada do minicírculo do cinetoplasto de *Leishmania (V.) braziliensis*, amplificando um fragmento de 138 pb. Utilizou-se 12,5 μL de Sybr Green, 9,5 μL H₂O milli-Q, e 0,5 μL de cada oligonucleotídeo iniciador para montagem do Master Mix. Em seguida foi incorporado 2,0 μL de DNA obtendo-se um volume final de 25 μL . As amostras foram testadas em duplicata e à amplificação constituiu-se de 40 ciclos onde houve desnaturação a 95 °C por 15s e anelamento dos oligonucleotídeos a 60 °C por 1 min, seguindo as especificações Applied Biosystems (2005). Limite mínimo de detecção da técnica é de 1fg de DNA na amostra. A temperatura de *melting* para esse sistema varia de 78° a 81°C.

4.7 Teste Parasitológico

Foi realizado escarificação da lesão utilizando bisturi, em seguida colocado em lâmina e fixado em álcool metílico. Em seguida as lâminas foram coradas utilizando Giesam, deixando 10 minutos para melhor absorção e em seguida lavado em água corrente. Posteriormente foi observado em microscopia óptica pela técnica de pesquisa direta.

4.8 Definição de Caso

Caso: Paciente de área endêmica, com lesão e pesquisa direta positiva.

Não Caso: Pacientes de área endêmica, com lesão e pesquisa direta negativa.

4.9 Análise dos dados

A análise da sensibilidade, especificidade e acurácia foi realizada através do programa estatístico Open Epi (*Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health*) v. 3.01. O programa estatístico IBM SPSS (*Statistics Base*) v. 20.0 foi utilizado para a construção do banco de dados e geração de tabelas e gráficos. A concordância entre os testes moleculares utilizando saliva foi avaliada através do indicador Kappa (K), no SPSS. Para obtenção dos verdadeiros positivos e verdadeiros negativos comparamos os resultados da técnica com o exame de pesquisa direta.

5 RESULTADOS

Um total de 41 pacientes foi utilizado, onde 26 (63,4%) correspondem ao sexo masculino e 15 (36,6%) ao sexo feminino, com idade mínima de 11 anos e máxima de 73 anos, com uma média de 37 anos. Onde 78% desses pacientes eram residentes no município de Moreno, Região Metropolitana do Recife- PE, embora os outros pacientes foram oriundos do estado de Pernambuco, área endêmica da doença. Em relação à profissão 34,1% exerciam a função de agricultores, 19,5% do Lar, 19,5% estudantes e 26,9% outros. Quanto à forma clínica 82,9% apresentaram lesão ulcerada.

Os resultados obtidos nos testes moleculares com o fluido salivar de pacientes, 26 (63,4%) foram positivos pela PCR e 35 (85,4) amostras foram positivas pela a técnica de qPCR para LTA, uma vez que a quantificação de DNA foi $>1\text{fg}$. Após este resultado observou-se que um paciente evoluiu para cura espontânea, dois para a forma recidiva cútis um para mucosa (Tabela 1).

Tabela 1. Características clínica, epidemiológica e laboratorial dos pacientes com lesões compatíveis com LTA.

PACIENTES	SEXO	IDADE (anos)	PROCEDÊNCIA	PROFISSÃO	FORMA			DNA (fg)	OBS
					CLINICA	PCR	qPCR		
PSH01	F	22	Paulista - PE	Estudante	Ulcerada	-	+	18,788	
PSH02	F	19	Moreno - PE	Do lar	Recidiva	+	+	326,759	
PSH03	M	38	Moreno - PE	Agricultor	Ulcerocrostoso	+	+	532,378	RC
PSH04	F	30	Moreno - PE	Costureira	Ulcerada	-	+	221,34	
PSH05	M	21	Moreno - PE	Agricultor	Ulcerada	+	+	3,981	
PSH06	F	28	Jaboatão - PE	Estudante	Ulcerada	-	-	0,00	
PSH07	F	71	Moreno - PE	Do Lar	Placa	+	+	275,029	
PSH08	M	67	Itamaracá -PE	Pescador	Ulcerada	-	-	0,00	
PSH09	M	53	Moreno - PE	Pedreiro	Ulcerada	+	+	1384,762	
PSH10	M	23	Moreno - PE	Carregador	Eritrematosa	+	+	1384,762	
PSH11	M	49	Moreno - PE	Motorista	Ulcerada	-	+	160,824	
PSH12	F	32	Moreno - PE	Do lar	Ulcerada	+	+	619,602	
PSH13	M	21	Paudalho - PE	Militar	Ulcerada	-	-	0,00	
PSH14	M	72	Jaboatão - PE	Do Lar	Ulcerada	+	+	232,886	

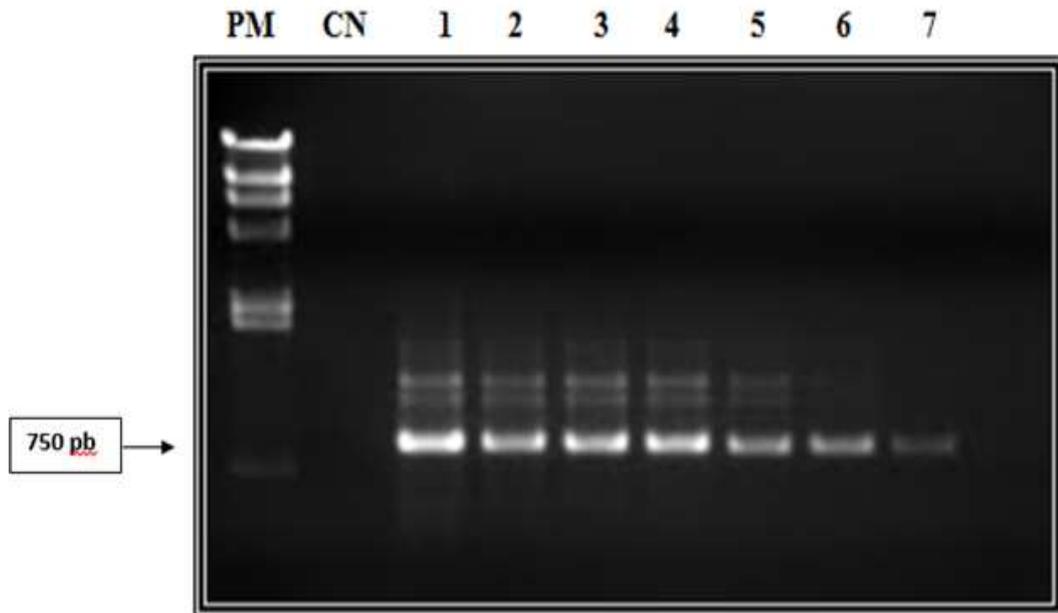
PACIENTES	SEXO	IDADE (anos)	PROCEDÊNCIA	PROFISSÃO	FORMA			DNA (fg)	OBS
					CLINICA	PCR	qPCR		
PSH15	M	49	Moreno - PE	Agricultor	Ulcerada	+	+	483,569	
PSH16	M	19	Goiana - PE	Militar	Ulcerocrostoso	-	-	0,695	
PSH17	M	58	Moreno - PE	Agricultor	Ulcerada	+	+	296,803	
PSH18	M	13	Moreno - PE	Estudante	Ulcerada	+	+	1230,082	
PSH19	M	24	Moreno - PE	Agricultor	Ulcerada	+	+	649,415	
PSH20	M	53	Moreno - PE	Agricultor	Ulcerade Estase	+	+		
PSH21	M	43	Moreno - PE	Pedreiro	Ulcerada	+	+	14,214	RC
PSH22	M	73	Moreno - PE	Agricultor	Ulcerada	+	+	523,837	
PSH23	F	52	Moreno - PE	Agricultor	Ulcerada	+	+	658,104	C.E
PSH24	F	55	Cabo de Santo Agostinho - PE	Do lar	Disseminada	+	+	185,477	
PSH25	M	30	Moreno - PE	Do lar	Ulcerada	+	+	630,096	
PSH26	M	64	Moreno - PE	Do lar	Ulcerada	+	+	444,91	
PSH27	M	32	Goiana	Refratarista	Ulcerocrostoso	-	-	0,00	
PSH28	M	13	Moreno	Estudante	Ulcerada	-	-	0,00	
PSH29	F	35	Escada	Do lar	Ulcerada	-	+	3,117	
PSH30	F	11	Moreno - PE	Estudante	Ulcerada	+	+	715,487	
PSH31	M	30	Moreno - PE	Do lar	Ulcerada	+	+		
PSH32	M	45	Moreno - PE	Agricultor	Ulcerada	+	+		
PSH33	M	16	Bezerros - PE	Agricultor	Ulcerocrostoso	+	+	651,513	M
PSH34	M	63	Moreno - PE	Agricultor	Ulcerocrostoso	+	+	481,053	
PSH35	M	45	Goiânia - PE	Agricultor	Ulcerada	-	+	2,145	
PSH36	F	42	Moreno - PE	Do Lar	Ulcerada	-	+	31,687	
PSH373	M	55	Moreno - PE	Agricultor	Ulcerada	+	+	628,128	
PSH38	F	21	Moreno PE	Estudante	Ulcerada	-	+	28,860	
PSH39	M	23	Paudalho - PE	Militar	Ulcerada	-	+	4,887	
PSH40	F	11	Moreno - PE	Estudante	Ulcerada	-	+	217,809	
PSH41	F	13	Moreno - PE	Estudante	Ulcerada	+	+	645,790	

Legenda: (C.E) Cura espontânea, (R.C) Recidiva Cútitis, (M) Mucosa. Fonte: BRITO M.E.F. 2019

5.1 Curva de Diluição - PCR

A partir da realização da curva de diluição de *Leishmania (Viannia)* sp. obteve-se um limite de detecção de 10fg para de DNA padrão na PCR convencional. A figura 5 mostra o gel em agarose com amplificação dos produtos de PCR.

Figura 5 – Curva de diluição por eletroforese em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídeo, mostrando bandas específicas para *Leishmania (Viannia) braziliensis* com limite de detecção de 10fg de DNA padrão.



Legenda: PM (Marcador de peso molecular DNA) CN (controle negativo) linhas 1 a 7 (concentração de DNA: 10ng/μL, 1ng/μL, 100 pg/μL, 10pg/μL, 1pg/μL, 100fg/μL, 10fg/μL). Fonte: O autor.

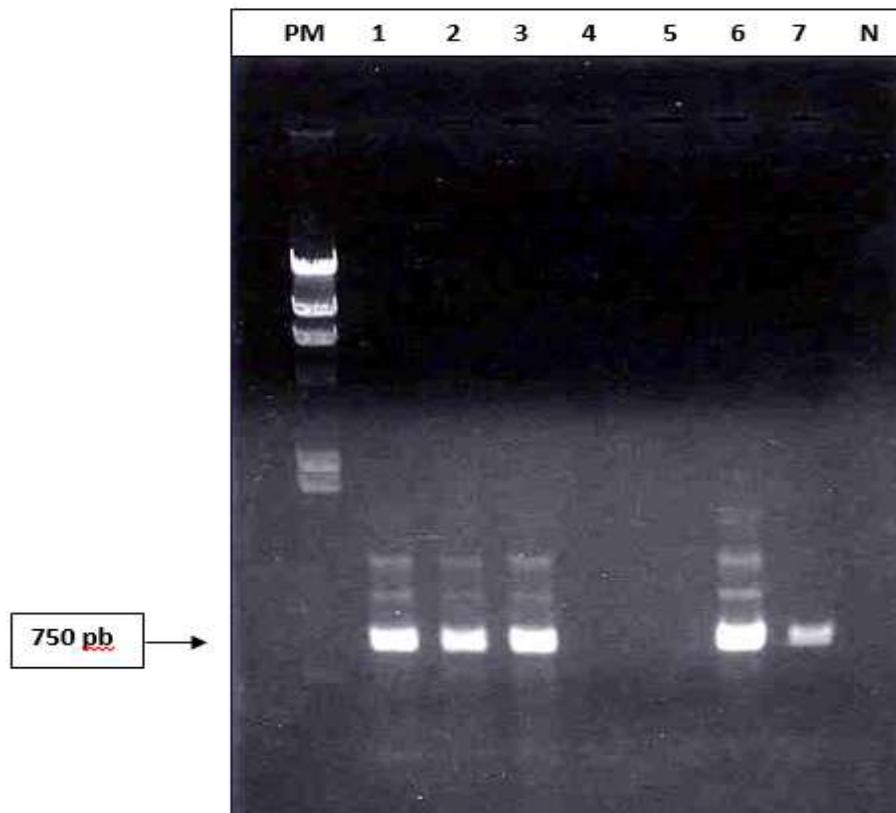
5.2 Cultura *in vivo*

Com a cultura *in vivo*, das 41 amostras, sete foram isolados e em seguida depositados na Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC-IOC, Rio de Janeiro e foram caracterizados, obtendo-se como resultados a espécie de *L.(V.) braziliensis*.

5.3 PCR Convencional

Os resultados obtidos a partir dos produtos de PCR através da eletroforese em gel de agarose a 1% confirmam que as amostras pertencem ao subgênero *Viannia*. A figura 6 demonstra a amplificação dos produtos de PCR, utilizando os iniciadores LEIB1 e LEIB2 que amplificam os fragmentos de 750 pb e são específicos para o subgênero.

Figura 6. Visualização da amplificação dos produtos da PCR, utilizando os oligonucleotídeos LEIB1 e LEIB2 que amplificam os fragmentos de 750 pb em gel de agarose 1%.



Legenda PM (Peso molecular), 1 a 6 (Amostras de DNA), 7 (Controle positivo)
N (Controle negativo). Fonte: O autor.

5.4 PCR em Tempo Real

Segundo os padrões estabelecidos por Paiva–Cavalcanti (2013), o limite mínimo de detecção do DNA genômico da *L. (V.) braziliensis* foi >1fg na qPCR. A curva de diluição realizada neste trabalho também encontrou o mesmo limite, assim como na figura 7 abaixo.

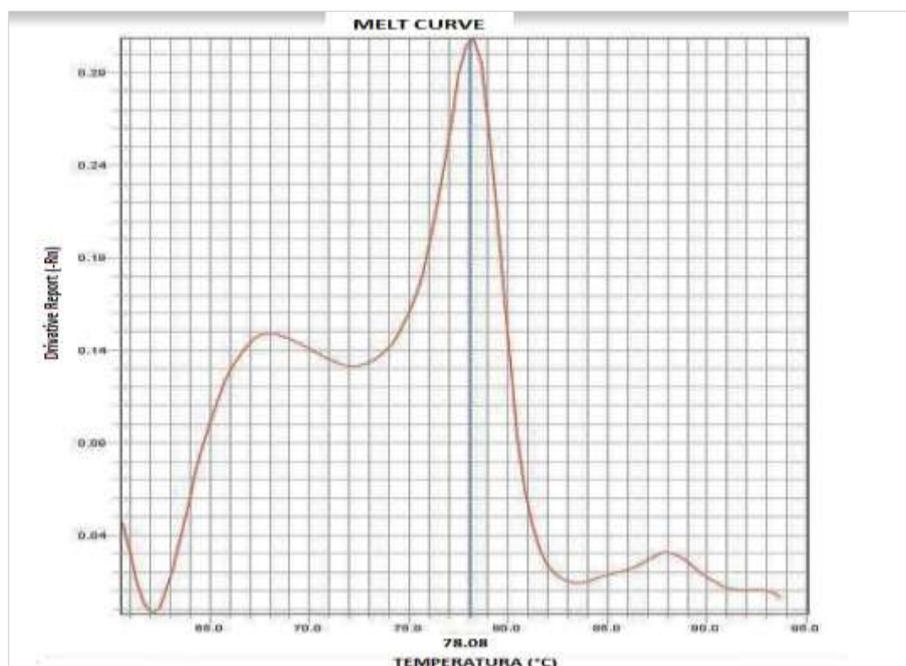
Figura 7. Curvas de amplificação para diluições seriadas do DNA de *L. (V.) braziliensis*



Fonte: Próprio autor

Os resultados obtidos confirmam que a *L.(V.) braziliensis* foi à espécie encontrada partir da observação da temperatura específica de dissociação dos oligonucleotídeos (78,08°C), assim como apresentado no figura 8.

Figura 8. Curva de melting com uma amostra de saliva positiva para *L. V. braziliensis* com pico de temperatura de 78,08°C (específico para essa espécie).



Legenda: Eixo y (Temperature): variação de temperatura da curva de melting. Amostras positivas para *L. (V.) braziliensis* com pico no intervalo entre 78° e 81°C. Eixo X (Derivative Repórter): Eixo da derivada. Fonte: O autor.

A pesquisa direta que permite a visualização do parasito nas formas amastigotas de *Leishmania spp.* obteve uma positividade em 10/37 (27%) das lâminas. Na análise comparativa entre diagnóstico parasitológico e os diagnósticos moleculares (PCR e qPCR) a relação entre a técnica de PD e PCR obteve concordância de resultados em 20/37 (54,05%) e entre PD e qPCR de 16/37 (43,2 %) como demonstrado na tabela 2. Do total das amostras de saliva dos pacientes, em quatro não foram realizadas a PD.

5.5 Análise de Dados

Utilizando-se a pesquisa direta como “padrão ouro” do estudo para a definição de caso de LTA e estabelecer a presença ou ausência de doença, calculou-se a sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes moleculares com seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Os dados foram apresentados na tabela 3. Na avaliação comparativa entre as

sensibilidades das técnicas moleculares, o p foi igual a 0.0384 e a concordância utilizando o indicador Kappa foi de 0,494 ou 49,4%.

Tabela 2. Concordância entre pesquisa direta e testes moleculares

Concordância	Pesquisa Direta
PCR	20/37 (54,05%)
qPCR	16/37 (43,2%)

Fonte: O autor.

Tabela 3. Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes moleculares.

	PCR (Convencional)	PCR (Tempo Real)
Sensibilidade	88.9% (56.5, 98)	100% (72.3, 100)
Especificidade	44.4% (27.6, 62.7)	22.2% (10.6, 40.8)
Acurácia	55.6% (39.6, 70.5)	43.2% (28.7, 59.1).

Fonte: O autor

6 DISCUSSÃO

O diagnóstico laboratorial da LTA é de fundamental importância, em virtude da dificuldade para a definição dos casos, que envolve o diagnóstico diferencial com outras dermatoses granulomatosas. A confirmação da doença é importante por causa da dificuldade do tratamento dos pacientes, principalmente pelos sérios efeitos colaterais dos medicamentos utilizados (GONTIJO *et al.*, 2003; CARVALHO, 2003; ALVAR *et al.*, 2012).

O avanço tecnológico do século XX favoreceu o desenvolvimento de uma variedade de técnicas laboratoriais e trouxe uma importante contribuição ao diagnóstico das doenças em geral e das infecciosas em particular. Entretanto, o diagnóstico da LTA ainda não possui um teste confirmatório com alta acurácia e desempenho. O fato da LTA se tratar de doença negligenciada é resultado em grande parte da falta de investimentos em pesquisa e consequentemente tecnologias necessárias a sua complexidade (ALVAR *et al.*, 2012).

Uma importante limitação no diagnóstico da LTA é a coleta das amostras de material dos pacientes para exame. A coleta de material das lesões é feita geralmente empregando métodos invasivos como biópsia, escarificação, punção aspirativa da borda da lesão, que causam desconforto. Elas são particularmente de difícil execução em crianças e nas lesões na face ou em outras partes delicadas do corpo do paciente. Procedimentos como a biópsia exigem técnicos especializados e devem ser realizados apenas por especialistas e em ambiente hospitalar, ainda assim, com risco de infecções secundárias por bactérias (COSTA, 2009).

Métodos alternativos para coleta de amostras biológicas para o diagnóstico de LTA têm sido buscados com o objetivo de proporcionar maior conforto aos pacientes e maior eficácia na confirmação da doença. A coleta de fluido salivar demonstra ser então uma alternativa válida para o diagnóstico de Leishmaniose, podendo ser aplicado em situações de trabalho de campo, por exemplo, que requer uma coleta rápida e de fácil manuseio, ou ainda em pediatria devido à dificuldade na coleta de amostras em crianças. Além disto, por ser um fluido orgânico dispensando em um recipiente estéril a obtenção é de baixo custo e em termos de biossegurança o risco de contaminação é praticamente inexistente, como descrito por (CORVALAN *et al.*, 2011).

O fluido salivar associado às técnicas moleculares utilizados para o diagnóstico de LTA ainda são limitados nos trabalhos que apontam este método como um instrumento na coleta desses parasitos e, além disso, não há constatação da técnica ter sido preconizada por órgãos de saúde pública para a enfermidade em questão (BRITO *et al.*, 2012; 2018; GOMES *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2008, 2012; LEITE *et al.*, 2010, 2011; CORVALAN *et al.*, 2011; LOMBARDO *et al.*, 2012; MIMORI, 2002). A coleta de fluido salivar para isolamento da *Leishmania* spp. passou a ser incorporado no uso rotineiro de pesquisa no SRL – IAM/FIOCRUZ em 2010 (BRITO *et al.*, 2008).

A definição dos casos da LTA inclui informações epidemiológicas, aspectos clínicos, exames laboratoriais e frequentemente é necessária a associação desses elementos (RODRIGUES *et al.*, 2002). Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que o maior percentual correspondeu ao sexo masculino, com idade média de 37 anos, mostrando a exposição do homem ao vetor e também na sua idade produtiva (GONTIJO *et al.*, 2003). Embora, Brandão-Filho *et al.*, (2003) observaram que a LTA poderá acometer toda a população independente de idade e sexo.

As diferenças encontradas em nosso estudo entre os resultados referente da forma clínica das lesões, mostraram que a maioria era do tipo ulcerada localizada, onde em alguns casos apresentaram da forma ulcero-crostosa e ou em placa. No entanto, alguns pacientes evoluíram ou para cura espontânea, ou para mucosa, forma mais severa da doença, e outros por razões diversas, como: o tratamento incompleto ou resistente ao tratamento que evoluiu para recidiva cútis (COSTA, 2009).

Foram obtidos sete isolados do fluido salivar através da cultura *in vivo*, e identificado pelas técnicas moleculares e isoenzimas confirmando a espécie de *L. (V.) braziliensis* circulante no estado de Pernambuco. Esses dados são inéditos, uma vez que pouco se conhece o tropismo do parasito (BRITO *et al.*, 2018). Em relação aos achados obtido através da pesquisa direta é justificada pela quantidade de parasitos nas lesões, a qual é inversamente proporcional ao tempo de evolução da doença, podendo estar também relacionada a espécie de parasito (BRITO *et al.*, 1993).

Estudos realizados por Brito *et al.*, (2009, 2012) e Weigle *et al.* (2002) analisaram o tempo de evolução da infecção com o número de *Leishmania* presentes em nas lesões de LTA. As lesões de até seis meses obtiveram 56% de sensibilidade comparada a 8,7% em lesões com tempo igual ou superior a seis meses. A positividade das técnicas moleculares também pode estar correlacionada ao tipo de amostra e a padronização das técnicas. A PCR convencional apresentou em um estudo realizado por Rodrigues (2000) um limite de detecção de 10 fg de DNA, uma sensibilidade de 93,4% em material de biópsia e uma especificidade de 100%. E, enquanto a qPCR possui um limite de detecção de 1fg com alta sensibilidade, especificidade e acurácia em torno de 99 a 100%(PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2013). As referidas técnicas têm como alvo o kDNA da *Leishmania*.

Nos resultados apresentados, nove amostras de fluido salivar de pacientes tiveram discordância entre os testes moleculares. As amostras PSH29, PSH35 e PSH39 apresentaram respectivamente uma quantidade de DNA de 3,12; 2,15 e 4,89 as quais não foram detectadas pela PCR convencional. Isso deve-se ao limite de detecção da qPCR ser mais sensível (1fg de DNA) do que o da PCR convencional (10fg) (PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2013). Esse limite pode ainda ser confirmado pela amostra PSH16 com DNA 0,695 o qual não foi detectado por nenhuma das técnicas.

A sensibilidade que reflete os verdadeiramente positivos para as técnicas aplicadas, a qPCR obteve melhor resultado comparado à PCR, sendo sensível em 100%. Este achado ressalta a relevância da aplicação da qPCR como método confirmatório para a LTA (PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2013). Entretanto, a especificidade e acurácia resultaram em melhores proporções para a PCR. Estudos realizados por Andrade *et al.* (2005) mostraram que a PCR foi 100% positiva e específica em biópsias de pele, pois não houve detecção do produto de amplificação em biópsias obtidas de pacientes com lesões cutâneas, decorrentes de outras enfermidades ou mesmo em biópsias de pele de pacientes normais. A confirmação parasitológica, nesse mesmo trabalho, foi possível em 66% dos casos. Esses dados confirmam que a PCR é o melhor método diagnóstico da LTA quando comparado com a confirmação parasitológica. Uma maior especificidade pode contribuir diretamente para o entendimento da epidemiologia da leishmaniose em decorrência da necessidade da confirmação parasitológica diante da possibilidade de tratamento, especialmente no caso de LTA causada por *L. braziliensis* onde a escassez de parasitas na lesão é um dos marcos da infecção.

Comparando as sensibilidades dos testes moleculares obtivemos p-valor $<0,05$ indicando que há diferença entre os valores das sensibilidades da PCR Convencional e da qPCR, podendo então afirmar que a sensibilidade da qPCR é estatisticamente maior que a da PCR. O indicador Kappa, que mede a reprodutibilidade pelo grau de concordância entre dois observadores foi significativo no estudo realizado. O p-valor obtido foi $<0,001$, que, de acordo com a classificação do indicador descrito em Landis *et al*, (1977), a concordância entre as técnicas foi moderada.

A disponibilização de testes moleculares para o diagnóstico de doenças infecciosas, trouxe novas questões a respeito da avaliação estatística dos novos testes, decorrentes de sua elevada sensibilidade em comparação aos testes convencionais (MC ADAM, 2000). Segundo a Organização Mundial de Saúde, torna-se oportuno que as pesquisas se concentrem no desenvolvimento de novos conhecimentos, principalmente no emprego de novos modelos diagnósticos para a LTA, pois trata-se de uma doença emergente e negligenciada (REMME *et al*. 2001).

7 CONCLUSÃO

O resultados demonstraram o potencial da coleta não-invasiva como amostra de escolha para o diagnóstico com boa performance quando associada aos testes moleculares. Referente aos testes a qPCR obteve melhor sensibilidade e a PCR uma maior especificidade e acurácia comparadas ao teste parasitológico convencional utilizando a saliva como substrato, demonstrando potencial de aplicação em conjunto quando necessário para obter uma maior eficiência, auxiliando em um diagnóstico mais específico e sensível para *L (V.) braziliensis*.

Houve moderada concordância entre os testes moleculares utilizados, reafirmando o potencial de identificação das técnicas. Com a análise dos dados clínicos e epidemiológicos verificou-se que indivíduos do sexo masculino são os mais afetados nas áreas endêmicas, principalmente devido à atividade laboral ao qual desenvolvem, em sua maioria relacionada à agricultura.

A utilização do método de coleta a partir de fluido salivar no Serviço de Referência em Leishmanioses (SRL) do Instituto Aggeu Magalhães da FIOCRUZ PE é pertinente ao desenvolvimento deste modelo inovador de coleta de *Leishmania* spp.

8 REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, J. L. A **Diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana utilizando a saliva coletada com swab**. 2015. P.72. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, San Francisco v. 7, n. 5, p. e35-671, 31 maio 2012.
- ANDRADE, B. et al. Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, Falácias e Perspectivas. **Gazeta Médica da Bahia**, Rio de Janeiro v. 74, n. 1, p. 8, 27 Maio 2008.
- APPLIED biosystems. **Real time PCR systems**. Absolute quantification getting started guide. Atlanta; 2005.
- BRANDÃO-FILHO, S.P. **Ecoepidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Zona da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco**. 2001. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London v. 93, n. 5, p. 488–494, set. 1999.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. **Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia)braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brasil**. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 97,p. 291-296, 2003a.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Infecção natural de *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania braziliensis* na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, London, v. 36, supl. 1, p. 396, 2003b.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia)braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State,Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. **Guia de vigilância em Saúde**. Brasília, 2017.p. 705.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 182p. 2007
- BRITO, M. E. F. et al. Clinical epidemiological profile of American tegumentary leishmaniasis at the Pinto Sugar Mill in Moreno Municipality, Greater Metropolitan Recife, Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 2445–2448, out. 2008.
- BRITO, M. E. F. et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 4, p. 425–429, 26 jul. 2012.

BRITO, M. E. F. et al. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 95, n. 2, p. 203–206, 1 mar. 2001.

BRITO, M. E. F. et al. Human cutaneous leishmaniasis due to a new enzymatic variant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* occurring in Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 4, p. 633–634, dez. 1993.

BRITO, M. E. F. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from the saliva of patients in a cutaneous leishmaniasis-endemic area of northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 4, 2018.

BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil: Species diversity of *Leishmania* parasites. **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v. 14, n. 10, p. 1278–1286, out. 2009.

CERUTTI, P. H. et al. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar Americana: uma revisão de literatura. **Revista de Patologia do Tocantins**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 4, p. 55, 28 nov. 2017.

CORVALAN, F. et al. DNA identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Oxford v. 17, n. 1, p. 98–102, 2011.

COSTA, J. M. L. et al. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, Rio De Janeiro, v. 1 n. 79, p. 14, 2009.

DANTAS-TORRES, F. et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio De Janeiro, v. 43, n. 6, p. 733–736, dez. 2010.

DE ALMEIDA FERREIRA, S. et al. Canine Skin and Conjunctival Swab Samples for the Detection and Quantification of *Leishmania infantum* DNA in an Endemic Urban Area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 4, p. e1596, 10 abr. 2012.

DE BRUIJN, M. H. L.; BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: Specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, Basel, v. 52, n. 1, p. 45–58, set. 1992.

DE PAIVA CAVALCANTI, M. et al. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 27, n. 3–4, p. 122–128, jun. 2013.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, n. 3, p. 239–243, maio 2001.

DUARTE, M. C. et al. Proteins Selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an Immunoproteomic Approach with Potential Serodiagnosis Applications for Tegumentary Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, D.C, v. 22, n. 11, p. 1187–1196, nov. 2015.

ERESH, S.; MCCALLUM, S. M.; BARKER, D. C. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. **Parasitology**, London, v. 109, n. 04, p. 423, nov. 1994.

FAGUNDES-SILVA, G. A. et al. *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi*: rare enough to be neglected?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 6, p. 797–800, set. 2015.

FERREIRA, S. DE A. et al. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR–hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 152, n. 3–4, p. 257–263, abr. 2008.

FORKNER, C. E.; ZIA, L. S. Viable *leishmania donovani* in nasal and oral secretions of patients with kala-azar and the bearing of this finding on the transmission of the disease. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 59, n. 4, p. 491–499, 31 mar. 1934.

FREEMAN, K. American cutaneous leishmaniasis. London, **Journal of the Royal Army Medical Corps**, New York, v. 129, n. 3, p. 167–173, 1983.

FURTADO, Tancredo. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **An Bras Dermatol**, Amsterdam v. 55, n. 2, p. 81–6, 1980.

FURTADO, T. A. Doenças Infecciosas com Manifestações Dermatológicas. Rio de Janeiro, **Editores Médica e Científica**, Rio de Janeiro, p. 319–338, 1994.

GOMES, C. M. et al. Field Validation of SYBR Green- and TaqMan-Based Real-Time PCR Using Biopsy and Swab Samples To Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an Area Where *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Is Endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 55, n. 2, p. 526–534, fev. 2017.

GONTIJO, Bernardo; CARVALHO, MLR de. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev Soc Bras Med Trop**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, London v. 8, n. 4, p. 419–433, abr. 2010.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. New York, **Nature Biotechnology**, v. 11, n. 9, p. 1026–1030, set. 1993.

KAUNITZ, J. D. The Discovery of PCR: ProCuRement of Divine Power. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 60, n. 8, p. 2230–2231, ago. 2015.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, Washington, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, abr. 2006.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, Washington v. 33, n. 1, p. 159, mar. 1977.

LEITE, R. S. et al. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 170, n. 3–4, p. 201–206, jun. 2010.

LOMBARDO, G. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 184, n. 1, p. 10–17, fev. 2012.

LUCIANO, R. M. et al. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Chicago, v. 46, n. 3, p. 181, 1 jun. 2009.

MARZOCHI, M. C. DE A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. suppl 2, p. S359–S375, 26 jul. 1994.

McADAM, A.J. Guest commentary. Discrepant analysis: how can we test a test? **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, p. 2027-2029, 2000.

MENDONÇA, M. G. et al. Persistence of *Leishmania* Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure? **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, IL, v. 189, n. 6, p. 1018–1023, 15 mar. 2004.

MIMORI, T. et al. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 197–202, mar. 2002.

NEVES, DAVI PEREIRA; LINARDI, P. M.; VITOR, RWA. **Parasitologia humana**. 11ª. São Paulo: Atheneu, 2011.

NASCIMENTO, Sabrina; SUAREZ, Eloah Rabello; PINHAL, Maria Aparecida da Silva. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, Rio de Janeiro v. 67, p. 7-19, 2010.

OLIVEIRA, T.M.S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010.p.111, Dissertação Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia, Portugal.

DE PAIVA CAVALCANTI, M. et al. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in animals and humans. **Molecular and Cellular Probes**, London v. 27, n. 3–4, p. 122–128, jun. 2013.

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

POORNIMA, et al. Network pharmacology of cancer: From understanding of complex interactomes to the design of multi-target specific therapeutics from nature. **Pharmacological research**, London, v. 111, p. 290-302, 2016.

PHUMEE A, et al. Detection of *Leishmania siamensis* DNA in saliva by polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore, v. 89(5) p.899-905, 2013.

RAMANAN, P. et al. Clinical Experience With *Coxiella burnetii* Polymerase Chain Reaction (PCR). **Open Forum Infectious Diseases**, New York v. 3, n. suppl_1, 2016.

Ramos, J.V.A. **Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar americana no distrito de Três Ladeiras, município de Igarassu, estado de Pernambuco**. 2011.p.79, Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, New York ,v. 7, n. 9, p. 581–596, set. 2007.

REMME J. H. F et al. 2002. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 8(10), p.421-426, jan 2001.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2010.

RODRIGUES E. H. G, et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Vet Parasitol**. Amsterdam, v.184(1) p.10-7,2002.

RODRIGUES, E. H. G. et al. Evaluation of PCR for Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of Endemicity in Northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington v. 40, n. 10, p. 3572–3576, 2000 .

RODRIGUES, H.G.R. **Validação de abordagens moleculares para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar em Pernambuco**. 2000. p. 93. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 1989.

SCHWARTZ, E.; HATZ, C.; BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 6, n. 6, p. 342–349, jun. 2006.

SHAW JJ, LAINSON R. Ecology and epidemiology: New World. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Peters W, Killick-Kendrick R (Eds). **Academic Press**, London, UK, v.1, p. 291–363, 1987.

SILVA, A.O da. **Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA alvo da reação em cadeia da polimerase na detecção de Leishmania (Viannia) spp.** 2017. p 77. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife.

SILVA, J. et al. Dynamics of American tegumentary leishmaniasis in a highly endemic region for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in northeast Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 11, p. e0006015, 2 nov. 2017.

SIRIYASATIEN et al. Early detection of novel *Leishmania* species DNA in the saliva of two HIV-infected patients. **BMC Infect Dis**, London, v.16, p. 89, 2016.

TEMPONI, Andrea Oliveira Dias et al. Ocorrência de casos de leishmaniose tegumentar americana: uma análise multivariada dos circuitos espaciais de produção, Minas Gerais, Brasil, 2007 a 2011. **Cadernos de saúde pública**, Rio de Janeiro, v. 34, p. e00165716, 2018.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, London, v. 6, p. 750, 26 maio 2017.

VALENCIA et al. Non-invasive cytology brush PCR diagnostic and causative species identification of American cutaneous leishmaniasis in Peru. Amsterdam, **PLoS ONE**. v.7(11), p. 1-6, 2012.

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

WINTER, P. C. Polymerase Chain Reaction (PCR). In: JOHN WILEY & SONS, LTD (Ed.). **Encyclopedia of Life Sciences**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2005.

9 ANEXO 1



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente

Projeto: “Detecção de *Leishmania (Viannia) braziliensis* através de PCR convencional e qPCR em amostras de saliva de pacientes do estado de Pernambuco, área endêmica para Leishmaniose Tegumentar Americana”

Eu,, concordo em participar voluntariamente neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). Fui informado que o objetivo principal do referido projeto é melhorar o diagnóstico molecular da leishmaniose tegumentar americana a partir de um método que não utiliza material que corte a pele, para identificação de *Leishmania* spp.

Como faço parte do grupo de pacientes, serei submetido à coleta de leishmânias, através da dispensa de fluido salivar em um coletor sob condições estéreis. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executá-lo.

A presente proposta contribui para um melhor conhecimento da doença e diagnóstico mais rápido da leishmaniose tegumentar humana. Esse projeto levará a um tratamento mais rápido, com benefícios para o paciente, sendo considerado inovador, no que diz respeito ao procedimento de coleta de leishmânias. Antes de minha participação no referido projeto fui incentivado a pedir qualquer esclarecimento adicional que julgasse necessário, esclarecido por um participante do mesmo. Estou ciente que poderei recusar ou retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

Autorizo ao Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE) a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a minha identidade. Autorizo, também o IAM/FIOCRUZ-PE a estocar amostras biológicas para posteriores estudos.

Estou ciente que este documento é feito em duas vias, ficando uma em posse do participante e a outra com a equipe.

Assinatura do paciente ou menor

data

Assinatura do responsável

data

Assinatura do médico responsável – IAM/Fiocruz

data

Endereço profissional: Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), Rua: Arnaldo Marques, s/n Santo Amaro, Recife-PE. Fone:(81) 3413-1300.

Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n , Cidade Universitária, Cx. Postal 7472, CEP: 50670-420, Recife – PE, Brasil. Tel.: (081) 2101 2500; Fax: (081) 2101 2640; <http://www.cpqam.fiocruz.br>.