

Margem superior 3 cm

Configuração da página  
Papel A4

Tipo de Fonte:  
Times New Roman - TNR

Elemento textual - Espacejamento  
Entre linhas 1,5  
Tamanho da fonte: 12

Margem esquerda 3 cm

Margem direita 2 cm

Margem inferior 2 cm

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
(Times 14 maiúsculo centralizado)

DIEGO MOLINA DE OLIVEIRA  
(Times 12 maiúsculo centralizado)

(Título: Times 14 centralizado, minúsculo)

Padronização de técnicas moleculares para o diagnóstico e epidemiologia de  
leishmaniose tegumentar americana

Maringá  
2009  
(Times 12 centralizado)

DIEGO MOLINA DE OLIVEIRA  
(Times 12 maiúsculo centralizado)

(Título: Times 14 centralizado)

Padronização de técnicas moleculares para o diagnóstico e epidemiologia de  
leishmaniose tegumentar americana

(Times 12 parágrafo justificado recuo esquerdo)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da  
Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde  
Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thaís Gomes Verzignassi Silveira

Maringá  
2009

(Times 12 centralizado)

Ficha Catalográfica – Elemento obrigatório\*

\*Elaborado pela Biblioteca Central

MODELO

Essa ficha deve ser impressa no verso da folha de rosto

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR., **Brasil**)

Oliveira, Diego Molina de  
048p Padronização de técnicas moleculares para o diagnóstico e epidemiologia de leishmaniose tegumentar americana / Diego Molina de Oliveira. -- Maringá : [s.n.], 2009.  
67 f.

Orientador : Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thais Gomes Verzignassi Silveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias, 2009.

1. Leishmaniose. 2. PCR. 3. Leishmania. 4. Primers do DNA. 5. Flebotomíneos. 6. Epidemiologia. 7. Diagnóstico. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. II. Título.

CDD 21.ed. 616.9364

**FOLHA DE APROVAÇÃO\***  
(Times 14 maiúsculo centralizado)

**DIEGO MOLINA DE OLIVEIRA**  
(Times 12 maiúsculo centralizado)

(Título: Times 14 centralizado)

Padronização de técnicas moleculares para o diagnóstico e epidemiologia de leishmaniose tegumentar americana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

**COMISSÃO JULGADORA**

(os 2 professores da defesa e os 2 da qualificação)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thaís Gomes Verzignassi Silveira  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anita Hilda Straus Takahashi  
Universidade Federal de São Paulo

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosilene Fressatti Cardoso  
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 20 de março de 2009.

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

\*Elemento obrigatório.

DEDICATÓRIA(S)\*  
(Times 14 maiúsculo centralizado)

MODELO

Dedico este trabalho a todos  
aqueles que contribuíram para  
sua realização.

\*Elemento opcional.

## AGRADECIMENTO(S)\*

(Times 14 maiúsculo centralizado)

Aos meus pais, José Carlos Molina e Marlene de Oliveira Molina, pela confiança, dedicação, carinho e incentivo durante toda minha vida.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thais Gomes Verzignassi Silveira, pela sua dedicação, competência e profissionalismo, essenciais ao desenvolvimento dessa pesquisa, a quem tenho grande admiração, carinho e respeito.

Aos Pesquisadores Drs. Jorge, Valdrinez, Sandra, Dennis pela atenção e amizade.

Aos funcionários do laboratório de imunologia clínica: Paulo, Ivone, Marina e Zilda, pelo apoio, colaboração e amizade.

Aos colegas de minha turma do Mestrado em Ciências da Saúde.

À Karin Castro e Cristiane Legriffon, pela colaboração prestada ao desenvolvimento deste trabalho.

À Viviane Marcussi e Leonardo Velásquez, pela valiosa contribuição de amostras biológicas utilizadas durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos colegas de laboratório: Isabel, Cissara, Tatiane, Carlos Eduardo, Kézia, Daiane, Sara, Dayane, pelos momentos de descontração, amizade e apoio. Em especial ao Marcos, pelo companheirismo e colaboração durante essa jornada.

À minha namorada Renata, pelo incentivo, apoio, compreensão e carinho, sempre presente em todos os momentos.

A todos, que direta ou indiretamente ajudaram em meu trabalho, o meu sincero agradecimento.

À Deus

\*Elemento opcional.

## EPÍGRAFE\*

(Times 14 maiúsculo centralizado)

MODELO

Se quiseres conhecer uma pessoa,  
não lhe pergunte o que pensa,  
mas sim o que ama.

(SANTO AGOSTINHO)

\*Elemento opcional.



(Título: Times 14 justificado)

## Padronização de técnicas moleculares para o diagnóstico e epidemiologia de leishmaniose tegumentar americana

### RESUMO\*

(Times 12 centralizado negrito)

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma moléstia infecciosa crônica, não contagiosa e endêmica no continente americano, sendo desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. É causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas de animais para humanos por várias espécies de dípteros da subfamília Phlebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta de biologia molecular que tem apresentado várias vantagens para o diagnóstico, caracterização clínica e epidemiológica das leishmanioses. O objetivo deste trabalho foi analisar a sensibilidade de cinco pares de iniciadores da PCR descritos na literatura com distintos limiares de detecção de DNA de *Leishmania* e padronizar uma técnica de múltipla-PCR para detecção de *Leishmania (Viannia)* em flebotomíneos. Os diferentes iniciadores apresentaram variação na sensibilidade de amplificação na PCR convencional; 1fg/μL de DNA para os iniciadores MP3H e MP1L, 2 fg/μL para os iniciadores B1 e B2, 128 fg/μL para os iniciadores LU5A e LB3C, 32x10<sup>3</sup> fg/μL para os iniciadores LBF1 e LBR1 e 256x10<sup>3</sup> fg/μL para os iniciadores 13A e 13B. A múltipla-PCR detectou *Leishmania (Viannia)* em 3/130 (2,3%) “pools” de flebotomíneos da espécie *Nyssomyia neivai*. A taxa de infecção foi, considerando 1 flebotomíneo infectado em cada pool, de 0,23% ou 3/1278. Os resultados mostraram que existe a ampla variação quanto a sensibilidade analítica dos iniciadores, reforçando importância da escolha de iniciadores, que a múltipla-PCR contendo um controle interno de amplificação é uma ferramenta importante para detecção de infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos e que *N. neivai* pode ter um importante papel na transmissão de *Leishmania (Viannia)* no norte do Estado do Paraná.

**Palavras-chave:** Leishmaniose. PCR. *Leishmania*. iniciadores do DNA. Flebotomíneos.

\*Elemento obrigatório.

(Título: Times 14 justificado)

## Standardization of molecular techniques for diagnosis and epidemiology of American cutaneous leishmaniasis

### ***ABSTRACT***\*

(Times 12 centralizado negrito e itálico)

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a chronic infectious disease, non-contagious and endemic in the Americas, and from the southern U.S. to northern Argentina. It is caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted from animals to humans by several species of flies of the subfamily Phlebotominae, known generically by sandflies. The polymerase chain reaction (PCR) is a tool of molecular biology that has presented several advantages for the diagnosis, characterization and clinical epidemiology of leishmaniasis. The objective was to analyze the sensitivity of five pairs of PCR primers described in the literature with different sensitivity for detecting *Leishmania* DNA and a standardized technique of multiple-PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) in sandflies. Os different primers showed variation in sensitivity in conventional PCR; 1fg / mL of DNA for primers MP3H and MP1L, 2 fg/ $\mu$ L for primers B1 and B2, 128 fg/ $\mu$ L for primers LU5A and LB3C,  $32 \times 10^3$  fg/ $\mu$ L for primers LBF1 and LBR1 and  $256 \times 10^3$  fg/ $\mu$ L for primers 13A and 13B. The multiple-PCR detected *Leishmania* (*Viannia*) in 3/130 (2.3%) pools of sandflies of *Nyssomyia neivai*. The rate of infection was 0.23% or 3/1278 considering a sandfly infected in each pool. The results showed that there is wide variation in analytical sensitivity of primers, reinforcing the importance of the choice of primers; the multiple-PCR containing an internal amplification control is an important tool for the detection of natural infection by *Leishmania* in sandflies; and *N. neivai* can play an important role in transmission of *Leishmania* (*Viannia*) in north of Paraná State.

**Keywords:** Leishmaniasis. PCR. *Leishmania*. DNA primers. Sand flies.

Obs.: Conforme a norma da ABNT NBR 6022/2003 a palavra *Keywords* está escrita junta, em negrito e itálico.

\*Elemento obrigatório.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES\*

Figura 1 PCR usando como molde DNA de formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> (MHOM/BR/1987/M11272) diluído seriadamente.....	38
Tabela 1 Protocolos utilizados nas reações em cadeia da polimerase .....	39
Tabela 2 Resultados da Reação em cadeia da polimerase com os diferentes pares de oligonucleotídeos iniciadores em amostras biológicas de cães e humanos com lesões sugestivas de LTA, conforme diagnóstico por técnicas convencionais.....	40
Tabela 1 Flebotomíneos coletados no Recanto Marista, município de Doutor Camargo, Paraná.....	59
Figura 1 Ensaios de sensibilidade analítica da múltipla-PCR e PCR convencional com os distintos iniciadores .....	60
Figura 2 PCR de DNA de flebotomíneos. ....	61

OBS: Conforme norma da ABNT NBR 14724:2005/2006 – Elemento opcional, que deve ser elaborado de acordo com a ordem apresentada no texto, com cada item designado por seu nome específico, acompanhado do respectivo número da página. Quando necessário, recomenda-se a elaboração de lista própria para cada tipo de ilustração (desenhos, esquemas, fluxogramas, fotografias, gráficos, mapas, organogramas, plantas, quadros, retratos e outros).  
Obs.: Neste item, fica a critério do autor a elaboração de lista de ilustrações para demonstração de quadros, figuras e gráficos; ou utilizar as listas separadamente, conforme exemplos seguintes.

\*Elemento opcional.

MODELO

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e das publicações científicas (Capítulo II): *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (artigo 1) disponível em:

<<http://www.ajtmh.org/misc/ifora.shtml>> e

*Vector Borne and Zoonotic Diseases* (artigo 2)

disponível em: <

<http://www.liebertpub.com/products/manuscript.aspx?pid=67> >\*

\*Elemento obrigatório, de acordo com a Resolução Nº 022/2010-CI/CCS art 22 e normas para defesa de dissertação PCS aprovadas por meio da Portaria Nº 040/2010-PCS

## SUMÁRIO\*

1	CAPÍTULO I	13
1.1	Histórico	13
1.2	Leishmanioses	13
1.3	Leishmaniose tegumentar americana	14
1.5	O parasito	15
1.6	Os vetores	15
1.7	Epidemiologia	16
1.8	Diagnóstico	17
1.9	Técnicas moleculares na detecção de <i>Leishmania</i>	18
1.10	Justificativa	18
1.11	Objetivos	19
1.12	Referências	20
2	CAPÍTULO II	22
2.1	Artigo 1: Análise da sensibilidade de iniciadores da reação em cadeia da polimerase para detecção de <i>Leishmania</i> spp.	22
2.2	Artigo 2: Detecção de infecção natural por <i>Leishmania (Viannia)</i> em <i>Nyssomyia neivai</i> utilizando múltipla-PCR, no Estado do Paraná	41
3	CAPÍTULO III	62
3.1	Conclusões	62
3.2	Perspectivas futuras	63

### \*Elemento obrigatório

**OBS: Conforme a NBR 14724:2005/2006, item Paginação:**

**“Todas as folhas do trabalho, a partir da folha de rosto, devem ser contadas sequencialmente, mas não numeradas. A numeração é colocada, a partir da primeira folha da parte textual, em algarismos arábicos, no canto superior direito da folha, a 2 cm da borda superior, ficando o último algarismo a 2 cm da borda direita da folha. Havendo apêndice e anexo, as suas folhas devem ser numeradas de maneira contínua e sua paginação deve dar seguimento à do texto principal”.**

















Padronizar uma múltipla-reação em cadeia da polimerase para detectar infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos.

Investigar a infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos de região endêmica do Paraná utilizando múltipla-reação em cadeia da polimerase.

## REFERÊNCIAS

BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AVILES, H.; HARRIS, E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous Leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, p.102–109, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1980 a 2006. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela\\_lva\\_casos\\_brasil.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_lva_casos_brasil.pdf) (Acessado em 15/01/2009).

FELICIANGELI, M.D.; REYES, R.M.; LIMONGI, J.E. Natural infection of *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae) with parasites of the *Leishmania braziliensis* complex in a restricted focus of cutaneous Leishmaniasis in northern Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 393-394, 1988.

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

LIMA, A.P.; MINELLI, L.; TEODORO, U.; COMUNELLO, E. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento remoto orbital, no Estado do Paraná, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, p. 681-692, 2002.

LUZ, E.; MEMBRIVE, N.; CASTRO, E.A.; DEREURE, J.; PRATLONG, J.; DEDET, A.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V). braziliensis* in Paraná State, Southern Brazil. **Annals Tropical Medicine and Parasitology**, v. 94, p. 623-631, 2000.

MARZOCHI, M.C.A. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 63, p. 82-104, 1992.

NEITZKE, H.C.; SCODRO, R.B.L.; REINHOLD-CASTRO, K.R.; DIAS, A.C.; SILVEIRA, T.G.V.; TEODORO, U. Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 17-22, 2008.

REINHOLD-CASTRO, K.R.; SCODRO, R.B.L.; DIAS-SVERSUTTI, A.C.; NEITZKE, H.C.; ROSSI, R.M.; KÜHL, J.B.; SILVEIRA, T.G.V.; TEODORO, U. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 269-276, 2008.

REITHINGER, R.; LAMBSON, B.E.; BARKER, D.C.; DAVIES, C.R. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* sp in dog blood and bone marrow. **Jornal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 748-751, 2000.

RODRIGUEZ, N.; AGUILAR, C.M.; BARRIOS, M.A.; BARKER, D.C. Detection of *Leishmania (V.) braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 47-49, 1999.

SCODRO, R.B.L.; REINHOLD-CASTRO, K.R.; DIAS-SVERSUTTI, A.C.; NEITZKE-ABREU, H.C.; MEMBRIVE, N.A.; KÜHL, J.B.; SILVEIRA, T.G.V.; TEODORO, U. Investigation of Natural Infection by *Leishmania* in Sandflies of Paraná State, Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 483-491, 2008.

TEODORO, U.; SILVEIRA, T.G.V.; SANTOS, D.R.; SANTOS, E.S.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, O.; KÜHL, J.B. Frequência da fauna de flebotomíneos no domicílio e em abrigos de animais domésticos no peridomicílio, nos municípios de Cianorte e Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 30, p. 209-223, 2001.

VENAZZI, E.A.; ROBERTO, A.C.; BARBOSA-TESSMANN, I.P.; ZANZARINI, P.D.; LONARDONI, M.V.; SILVEIRA, T.G. Polymerase chain reaction with lesion scrapping for the diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 427-430, 2006.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/Leishmaniasis/en/> (Acessado em: 15/01/2009).

## CAPÍTULO II

**Artigo 1: “ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DE INICIADORES DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA DETECÇÃO DE *Leishmania* spp.”**

## ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DE INICIADORES DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA DETECÇÃO DE *Leishmania* spp

Diego M. Oliveira<sup>1</sup>, Maria V. C. Lonardoní<sup>2</sup>, Ueslei Teodoro<sup>2</sup>, e Thais G. V. Silveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde; <sup>2</sup> Departamento de Análises Clínicas

Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

Endereço para correspondência: Universidade Estadual de Maringá. Departamento de  
Análises Clínicas (DAC) – Av. Colombo 5790 CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar a sensibilidade analítica de diferentes iniciadores comumente utilizados em pesquisas epidemiológicas para detecção de DNA de *Leishmania* pela PCR e compará-los no diagnóstico de LTA. As análises da sensibilidade dos cinco pares de iniciadores (MP3H-MP1L; B1-B2; LU5A-LB3C; LBF1-LBR1; 13A-13B) descritos na literatura mostraram distintos limiares de detecção de DNA de *Leishmania*. Os iniciadores MP3H-MP1L apresentaram melhor desempenho para amplificação do DNA, detectando 1fg/μL de DNA de *Leishmania* spp. Os iniciadores 13A-13B apresentaram baixo desempenho detectando  $256 \times 10^3$ fg/μL de DNA de *Leishmania* spp. A ampla variação da sensibilidade analítica dos iniciadores usados na PCR e as significativas diferenças quando comparados aos métodos convencionais de diagnósticos de LTA, mostradas neste trabalho, enfatizam a importância da padronização da técnica de PCR, da análise da sensibilidade e da escolha de adequados oligonucleotídeos iniciadores.

**Palavras-chave:** Leishmaniose, PCR, *Leishmania*, Primers do DNA.



## INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas de animais para humanos pela picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos. Existe amplo espectro de formas clínicas, incluindo aquelas que afetam pele, mucosa, ou órgãos internos (Grimaldi & Tesh, 1993; Lainson & Shaw, 1998; Murray *et al.*, 2005).

As leishmanioses estão distribuídas em quatro continentes e são consideradas endêmicas em 88 países, 72 dos quais são países em desenvolvimento. A prevalência mundial da doença em humanos é estimada em 12 milhões de casos, com 400.000 a 600.000 novos casos por ano das formas viscerais e de 1 a 1,5 milhões das formas cutâneas (WHO, 2009).

No Brasil a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada no mínimo por seis espécies diferentes de *Leishmania*, na maioria dos casos a espécie envolvida é *L. (Viannia) braziliensis* (Gontijo & Carvalho, 2003).

Técnicas clássicas de diagnóstico para LTA ainda esbarram em uma série de limitações. Exames microscópicos de raspado de pele, mesmo rápidos e de baixo custo, apresentam limitações quanto à sensibilidade, em especial nas lesões crônicas. Técnicas de cultura *in vitro*, embora mais sensíveis, são suscetíveis a contaminações microbiológicas e são dificultadas pelo crescimento com exigências particulares dos diferentes parasitos (Armijos *et al.*, 1990). O teste de Montenegro apresenta boa especificidade, pois ativa o mecanismo de hipersensibilidade do tipo retardada, mas não pode distinguir entre infecção atual e passada. Técnicas de diagnóstico sorológico apresentam o inconveniente da reatividade cruzada de antígenos de *Leishmania* com anticorpos induzidos por outro cinetoplastídeo como *Trypanosoma cruzi*, (Camargo & Rebonato, 1969; Badaro *et al.*, 1986). Além disso, baixa sensibilidade, devido aos baixos títulos de anticorpo característico de LTA (Grimaldi & Tesh, 1993). Técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), oferecem uma

abordagem alternativa para a demonstração dos parasitos em amostras clínicas (White *et al.*, 1992). Devido à sua especificidade molecular, a detecção e caracterização genética das leishmânias podem ser realizadas simultaneamente (Harris *et al.*, 1993; 1996).

A ampla literatura sobre diagnóstico molecular da LTA tem proporcionando várias alternativas do uso de iniciadores que amplificam seqüências específicas de espécies de *Leishmania*, bem como, iniciadores que amplificam seqüências comuns a todas as espécies (Medeiros *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2005). O objetivo deste trabalho foi estudar a sensibilidade de diferentes iniciadores na PCR para detectar *Leishmania*, comumente utilizados em pesquisas epidemiológicas e compará-los no diagnóstico de LTA em amostras biológicas de cães e humanos de região endêmica.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Amostras biológicas.** Foram estudadas 73 amostras de DNA armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$  no Laboratório de Leishmanioses da Universidade Estadual de Maringá, sendo todas provenientes de região endêmica para LTA. Destas, 26 eram de cães (sangue, escarificação de lesão e biópsia de lesão) com origem no Município de Mariluz, Abatiá, Rio Bonito do Iguazu, Santa Cecília do Pavão e Nova América da Colina (Paraná) e 47 de humanos (escarificação de lesão) da região noroeste do Paraná atendidos pelo Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá.

As amostras de sangue foram coletadas e adicionadas a igual volume de uma solução de ACD (ácido cítrico 25mM; citrato de sódio 50mM; glucose 81mM). O material foi congelado a  $-18^{\circ}\text{C}$  até a extração de DNA. O DNA de sangue foi extraído pelo método clorofórmio-fenol (Velásquez *et al.*, 2006) ou guanidina-fenol (Venazzi *et al.*, 2006). O sedimento de DNA foi ressuspensionado em 50 $\mu\text{L}$  de tampão TE (TRIS 10mM; EDTA 1mM; pH 8,0).

As amostras de escarificação e biópsia de lesão foram adicionadas a 100µL de tampão STE (TRIS 10mM; EDTA 1mM; NaCl 0,1M; pH 8,0). O DNA de biópsia de lesão foi extraído pelo kit Puregene<sup>®</sup> (Gentra, EUA). Para extração do DNA de amostras de escarificação de lesão, os tubos contendo o material foram incubados a 95°C por 30 min, em Thermocycler (Biometra PC, Alemanha), centrifugados a 13.000g por 1min e o sobrenadante transferido para outro tubo e estocado a -18°C até o uso.

**Diagnóstico laboratorial convencional de LTA.** O diagnóstico convencional para LTA foi realizado pela pesquisa direta do parasito e de anticorpos pela imunofluorescência indireta.

Para pesquisa direta do parasito, lâminas contendo material de lesão foram coradas pelo Giemsa e analisadas quanto à presença de formas amastigotas (PA).

Para a reação de imunofluorescência indireta (IFI) utilizou-se como antígenos formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Silveira *et al.*, 1990) e conjugado anti-imunoglobulina G canina - fluoresceína (Sigma-Aldrich, EUA) ou conjugado anti-imunoglobulina G humana - fluoresceína (Biolab-Mérieux, Brasil). Os soros foram diluídos a partir de 1/20 e foram consideradas positivas as amostras que apresentaram títulos iguais ou superiores a 40 (Silveira *et al.*, 1996; 1999).

**Cultivo do parasito.** Formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1987/M11272) foram cultivadas em meio 199 (Invitrogen<sup>®</sup>, EUA) contendo 10% de soro bovino fetal (Invitrogen<sup>®</sup>, EUA), 1% de L-glutamina<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>, EUA) e 1% de urina humana, a 25°C em estufa B.O.D. (Logen Scientific, Brasil), até a fase estacionária de crescimento.

**Extração de DNA de *Leishmania*.** Os parasitos (aproximadamente 50mL de cultura) foram lavados 3 vezes por centrifugação (1.600g por 10min) em solução salina tamponada (SST) gelada. O DNA foi extraído pelo método guanidina-fenol (Venazzi *et al.*, 2006), ressuspendido em TE, quantificado utilizando o Kit Qubit<sup>™</sup> fluorometer (Invitrogen<sup>®</sup>, EUA) e

diluído serialmente (1024 ng/ $\mu$ L à 0,5fg/ $\mu$ L) para os testes de sensibilidade dos iniciadores na PCR.

**PCR.** Foram utilizados cinco diferentes pares de iniciador: MP3H (5'-GAACGGGGTTTCTGTATGC-3') e MP1L (5'-TACTCCCCGACATGCCTCTG-3') (Lopez *et al.*, 1993), B1 (5'-GGGGTTGGTGTAATATAGTGG-3') e B2 (5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3') (De Bruijn & Baker, 1992), LU5A (5'-TTTATTGGTATGCGAAACTTC-3') e LB3C (5'-CGT(C/G)CCGAACCCCGTGTC-3') (Harris *et al.*, 1998), LBF1 (5'-AAATTCGCGTTTTTTGGCCTCCCCG-3') e LBR1 (5'-GCATAAACTAGAGACGGAACAGAG-3') (Marcussi *et al.*, 2008), 13A (5'-GTGGGGGAGGGGCGTTCT-3') e 13B (5'-ATTTTACACCAACCCCGAGTT-3') (Rodgers *et al.*, 1990). A mistura de reação (25  $\mu$ l) continha 1  $\mu$ M de cada iniciador (Invitrogen<sup>®</sup>, Brasil), 0,2 mM de dNTP (Invitrogen<sup>®</sup>, EUA), 1U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen<sup>®</sup>, EUA), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X tampão de enzima e 2 $\mu$ L de DNA extraído. Amplificação foi realizada em Termocicladora PC (Biometra, Alemanha). Tabela 1 resume os protocolos utilizados na PCR. O produto de amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídeo (0,1  $\mu$ g/mL), a 10-15 V/cm. Para cada 5 amostras amplificadas foram adicionados um controle positivo [DNA de *L. (V.) braziliensis*] e um controle negativo. Após a corrida, a verificação da presença de bandas foi realizada em transiluminador (Macro Vue UV-20 Hoefer).

**Análise estatística.** Para comparação dos resultados da PCR e métodos convencionais (PA e IFI) os dados foram analisados pelo teste de McNemar, utilizando o programa Statistica 7.1, considerando como significativo  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

Os resultados das análises de sensibilidade analítica para os cinco iniciadores mostraram limiares distintos de detecção de DNA de *Leishmania* spp. O par de iniciador

MP3H-MP1L foi o que apresentou melhor desempenho detectando 1fg/ $\mu$ L de DNA de *Leishmania (Viannia)*. Por outro lado, os iniciadores 13A-13B foram os que tiveram pior desempenho, detectando somente  $256 \times 10^3$ fg/ $\mu$ L de DNA de *Leishmania* spp. (Figura 1 e Tabela 1).

As análises de 8 amostras de escarificação e biópsia de lesões de cães com lesões sugestivas de LTA e que apresentavam PA e IFI positivas, mostraram positividade de 100,0% na PCR utilizando os iniciadores MP3H-MP1L, contrastando com 0,0% de positividade com os iniciadores LBF1-LBR1 e 13A-13B. Em 18 amostras de DNA extraído de sangue de cães com lesões sugestivas de LTA, porém PA e IFI negativas, a positividade da PCR com os iniciadores MP3H-MP1L foi de 83,3% e o menos sensível foi o LBF1-LBR1 (27,7%).

Em 27 amostras de DNA de lesões humanas sugestivas de LTA, com PA e IFI positivas, a positividade da PCR com os iniciadores MP3H-MP1L foi de 100,0% enquanto que a PCR com os iniciadores 13A-13B apresentou positividade de 22,2%. Nas 20 amostras de lesões sugestivas de LTA de humanos, porém com PA e IFI negativas, a positividade da PCR com os iniciadores MP3H-MP1L foi de 60,0% enquanto que as PCR com os iniciadores LU5A-LB3C, LBF1-LBR1 e 13A-13B apresentaram-se negativas.

Os resultados da PCR em amostras de lesões de humanos e cães utilizando os iniciadores MP3H-MP1L, considerados os mais sensíveis, demonstraram positividade superior aos dos métodos convencionais de diagnóstico de LTA, 39/47 (83,0%) nas amostras de humanos e 100% nas amostras de cães (Tabela 2).

A análise dos resultados da PCR de amostras de escarificação e biópsia de lesão de cães e escarificação de lesão de humanos, com suspeita de LTA, mostrou que a PCR com os iniciadores MP3H-MP1L foi mais sensível que os métodos convencionais (PA e IFI) ( $p = 0,015$ ). Os iniciadores LU5A-LB3C, LBF1-LBR1 e 13A-13B, detectaram menor número de amostras positivas quando comparados aos métodos convencionais, mostraram baixa sensibilidade, sendo estas diferenças estatisticamente significantes ( $p = 0,023$ ;  $p = 0,015$  e  $p =$

0,0001, respectivamente). A amplificação realizada com o par de iniciador B1-B2 não apresentou diferença estatística aos métodos convencionais ( $p=0,546$ ).

Foram verificados altos percentuais de positividade usando os diferentes iniciadores para amplificação do DNA pela PCR em amostras de sangue canino de região endêmica com lesões sugestivas de LTA, em especial com MP3H-MP1L que foi de 83,3%. A análise das lesões e soros destes mesmos cães por PA e IFI respectivamente, revelaram resultados negativos.

## DISCUSSÃO

A LTA é considerada um sério problema de saúde pública mundial. Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e incapacitantes (Gontijo & Carvalho, 2003). A necessidade de um bom diagnóstico laboratorial de LTA é devido à semelhança de sinais clínicos para outras doenças, e a importância de se iniciar rapidamente o tratamento adequado (Isaza *et al.* 2002).

A PCR oferece certas vantagens sobre as técnicas clássicas de diagnósticos e caracterização de patógenos infecciosos (White *et al.*, 1992). Quando aplicada apropriadamente, pode ser mais específica, sensível, versátil, e rápida que os métodos convencionais (Belli *et al.*, 1998).

Vários alvos moleculares para o desenvolvimento de novos iniciadores da PCR tem sido identificados em *Leishmania*, incluindo DNA do minicírculo do cinetoplasto (kDNA) (Belli *et al.*, 1998; Rodgers *et al.*, 1990; De Bruijn & Barker.,1992; Weigle *et al.*, 2002), o gene do *miniexon* (Marfurt *et al.*, 2003), DNA ribossomal (Uliana *et al.*, 1994), e o gene da glicose-6-fosfato desidrogenase (Castilho *et al.*, 2003), entre outros. A PCR utilizando os iniciadores MP3H-MP1L, que amplifica fragmentos somente do kDNA de espécies do subgênero *Leishmania* (*Viannia*), provou ser muito sensível, capaz de detectar 1fg/ $\mu$ L de

DNA, similar aos dados descritos por Lopes *et al.* (1993) e Velasquez *et al.* (2006), que detectaram 0,14fg/ $\mu$ L e 0,9fg/ $\mu$ L de DNA, respectivamente. Outro par de iniciador que apresentou ótima sensibilidade analítica foi o B1-B2, detectando 2fg/ $\mu$ L de DNA, valor este, muito próximo ao encontrado por De Bruijn & Baker (1992).

O gene do *miniexon* apresenta alto valor às técnicas de biologia molecular aplicado aos estudos das leishmanioses devido ao alto número de cópias no genoma e a presença de regiões conservadas e variáveis que difere entre os complexos de *Leishmania* (Fernandes *et al.*, 1996). Derivado deste gene o par de iniciador LU5A-LB3C tem capacidade de amplificar fragmentos de DNA de várias espécies de *Leishmania* do complexo *L. braziliensis*, incluindo *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana* (Harris *et al.*, 1998). Para este par de iniciador, o presente trabalho mostrou baixos índices de sensibilidade analítica (128fg/ $\mu$ L) quando comparado a estudos prévios realizados por Harris *et al.* (1998) estudando amostras de escarificação de lesão de pacientes na América do sul e central, e Gomes *et al.* (2007) em cães no Brasil, com detecção superior a 1fg/ $\mu$ L de DNA.

As técnicas moleculares de detecção e classificação de espécies de *Leishmania* tem dado papel de grande importância ao desenvolvimento de iniciadores relacionados ao kDNA (Weigle *et al.*, 2002). Recentemente, Marcussi *et al.* (2008) desenvolveram um par de iniciador (LBF1-LBR1) capaz de amplificar uma sequência específica à espécie *L. (V.) braziliensis*. Dados obtidos em nosso trabalho, usando este par iniciador, mostraram sensibilidade analítica de 32pg/ $\mu$ L de DNA, revelando expressiva diferença no limiar de detecção de DNA quando comparado ao resultado de 4ng/ $\mu$ L de DNA detectado por Marcussi *et al.* (2008). A amplificação do minicírculo do kDNA de *Leishmania (Viannia)* também foi realizada utilizando os iniciadores 13A-13B, que apresentaram baixa eficiência, detectando somente concentrações superiores a 256 pg/ $\mu$ L de DNA. Manna *et al.* (2004) empregando os mesmos iniciadores, porém com DNA de *Leishmania infantum*, demonstrou sensibilidade de 1pg/ $\mu$ L de DNA; valor mais expressivo, de 10fg/ $\mu$ L de DNA de *L. (V.) braziliensis*, foi

encontrado por Rodger *et al.* (1990). No entanto, este último utilizou método de DNA hibridização que teve como resultado o aumento a sensibilidade e, portanto, a eficiência do iniciador.

A PCR tem apresentado várias vantagens para o diagnóstico, caracterização clínica e epidemiológica das leishmanioses. Contudo, existe grande variação na sensibilidade da PCR, particularmente no que se refere ao método de extração de DNA, a escolha dos oligonucleotídeos iniciadores (Reithinger *et al.*, 2000; Ikonomopoulos *et al.*, 2003; Bensoussan *et al.*, 2006), as amostras clínicas utilizadas bem como do tempo de infecção (Venazzi *et al.*, 2006).

O diagnóstico laboratorial conclusivo de LTA é feito pela demonstração de formas amastigotas do parasito em material de escarificação ou biópsia de lesão e aspirado de medula (Gontijo & Carvalho 2003). Vários estudos de LTA causada por parasitos do complexo *L. braziliensis* na América Central e do Sul têm comparado o diagnóstico por PCR com as técnicas convencionais. Exceto para alguns poucos casos, os testes utilizando a técnica de PCR foram significativamente mais sensíveis que os métodos parasitológicos de diagnósticos (Medeiros *et al.* 2002; Rodriguez *et al.* 1994). Em nosso trabalho, 26 amostras de cães (escarificação, biópsia e sangue) e 47 amostras de humanos (escarificação) foram testadas pela PCR usando cinco pares de iniciadores com sensibilidade analítica variável. A PCR utilizando o par de iniciador MP3H-MP1L, que amplifica um fragmento da região do minicírculo do kDNA do subgênero *Leishmania (Viannia)*, apresentou alta positividade em amostras biológicas de escarificação e biópsia de lesão de cães e escarificação de lesão de humanos e foi significativamente mais eficiente que os métodos convencionais ( $p = 0,015$ ). Por outro lado, a PCR com os iniciadores LU5A-LB3C, LBF1-LBR1 e 13A-13B, demonstrou significativa ineficiência com relação aos métodos convencionais ( $p = 0,023$ ;  $p = 0,015$ ;  $p = 0,0001$ ; respectivamente). Embora o par de iniciadores B1-B2 tenha detectado maior número de amostras quando comparado às técnicas convencionais, esta diferença de positividade não



foi estatisticamente significativa ( $p = 0,546$ ). Todas as amostras detectadas pela PCR utilizando os iniciadores menos sensíveis também foram detectados pela PCR com iniciadores mais sensíveis, com exceção de uma (DNA de sangue canino), não detectada pela PCR-LBF1-LBR1 mas detectada pela PCR-13A-13B.

Detecção de DNA de *Leishmania* spp em amostras de sangue de cães de área endêmica tem sido relatada por vários autores (Llanos-Cuentas *et al.*, 1999; Reithinger *et al.*, 2000; 2003; Velasquez *et al.*, 2006). Em nosso trabalho, todos os iniciadores da PCR foram capazes de detectar DNA de *Leishmania* spp com diferentes percentuais de positividade em sangue de cães com lesões sugestivas de LTA, porém, com resultados negativos para os testes de PA e IFI.

Considerando os dados obtidos, os iniciadores da PCR direcionados ao diagnóstico e epidemiologia de leishmanioses apresentaram ampla variação quanto a sua sensibilidade analítica. Quando comparados aos métodos convencionais de diagnósticos de LTA mostraram diferença significativa, enfatizando a importância da padronização da técnica de PCR, da análise da sensibilidade e da escolha de adequados oligonucleotídeos iniciadores.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer à Fundação Araucária e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq–Processo 410550/2006-0) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

### **REFERÊNCIAS**

Armijos RX, Chico ME, Cruz ME, Guderian RH, Kreutzer RD, Berman JD, Rogers MD, Grogl M, 1990. Human cutaneous leishmaniasis in Ecuador: identification of parasites by enzyme electrophoresis. *Am J Trop Med Hyg* 42: 424--428.

- Badaro R, Reed SG, Barral A, Orge G, Jones TC, 1986. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. *Am J Trop Med Hyg* 35: 72--78.
- Belli A, Rodriguez B, Aviles H, Harris E, 1998. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 58: 102--109.
- Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL, 2006. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 44: 1435--1439.
- Camargo ME, Rebonato C, 1969. Cross-reactivity in immunofluorescence test for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *Am J Trop Med Hyg* 18: 500--505.
- Castilho T, Shaw MJ, Floeter-Winter LM, 2003. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J Clin Microbiol* 41: 540--546.
- De Bruijn MHL, Barker DC, 1992. Diagnosis of New World Leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop* 52: 45--58.
- Fernandes O, Bozza M, Pascale JM, de Miranda AB, Lopes UG, Degraive WM, 1996. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania (Viannia)*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 279--284.
- Garcia FCB, Santos SSR, Chociay MF, Medeiros ACR, Roselino AMF, 2005. Métodos subsidiários para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA): comparação dos resultados do seqüenciamento de DNA e da PCR-RFLP para determinação da espécie de *Leishmania* em amostras cutâneo-mucosas. *An Bras Dermatol* 80 (Suppl. 3): 340--345.

- Gomes AH, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, Garcia AS, Araujo MF, Pereira-Chiocola VL, 2007. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 144: 234--241.
- Gontijo B, Carvalho MLR, 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 36 (Suppl. 1): 71--80.
- Grimaldi Jr G, Tesh RB, 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6: 230--250.
- Harris E, Lopez M, Arevalo J, Bellatin J, Belli A, Moran J, Orrego O, 1993. Short courses on DNA detection and amplification in Central and South America: the democratization of molecular biology. *Biochem Educ* 21: 16--22.
- Harris E, Belli A, Agabian N, 1996. Appropriate transfer of molecular technology to Latin America for public health and biomedical sciences. *Biochem Educ* 24: 3--12.
- Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N, 1998. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol* 36: 1989--1995.
- Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG, 2003. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol* 113: 99--113.
- Isaza DM, Arboleda M, Restrepo M, McCann SHE, Barker DC, 2002. Validation of the polymerase chain reaction for the diagnosis of human cutaneous leishmaniasis in northwest Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 165--168.
- Lainson R, Shaw JJ, 1998. New World *Leishmaniasis*. The neotropical *Leishmania* species. Collier L, Balows A, Sussman M, eds. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases. Ninth edition. Arnold, London, 241--266.

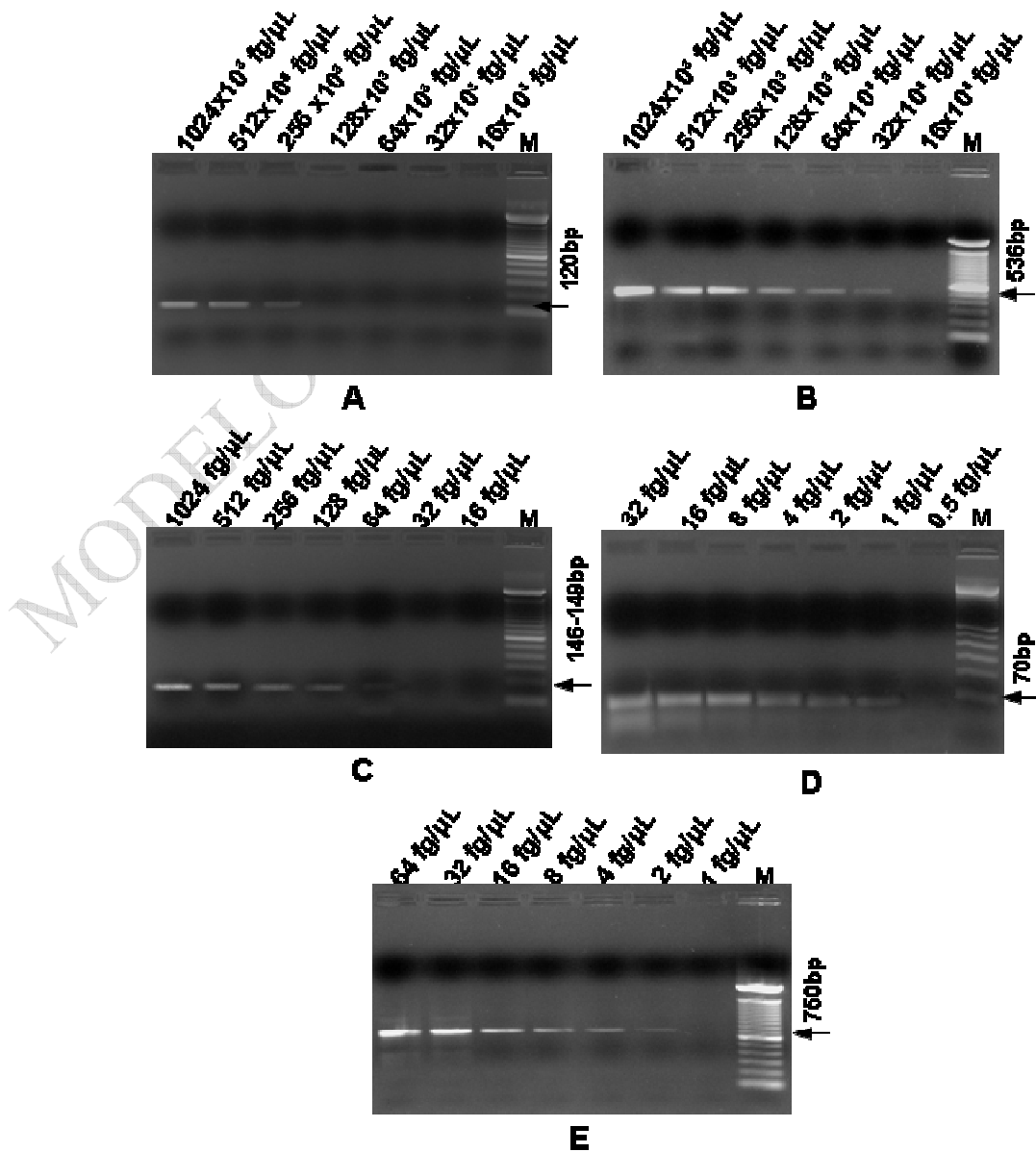
- Llanos-Cuentas EA, Roncal N, Villaseca P, Paz L, Ogusuku E, Pérez JE, Cáceres A, Davies CR, 1999. Natural infections of *Leishmania peruviana* in animals in the Peruvian Andes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 15--20.
- Lopez M, Ingá R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, Arevalo J, 1993. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg* 49: 348--356.
- Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE, 2004. Comparison of different sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 125: 251--262.
- Marcussi VM, Marcussi LM, Barbosa-Tessmann IP, Lonardon MV, Silveira TG, 2008. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: New primers for identification using polymerase chain reaction. *Exp Parasitol* 120: 300--305.
- Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I, 2003. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 41: 3147--3153.
- Medeiros ACR, Rodrigues SS, Roselino AMF, 2002. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 35: 421--424.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG, 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561--1577.
- Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Davies CR, 2000. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* sp in dog blood and bone marrow. *J Clin Microbiol* 38: 748--751.
- Reithinger R, Espinoza JC, Coutenay O, Davies CR, 2003. Evaluation of PCR as diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia)* spp in domestic dogs (*Canis familiaris*). *J Clin Microbiol* 41: 1486--1493.

- Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF, 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 71: 267--275.
- Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, Convit J, 1994. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol* 32: 2246--2252.
- Silveira TGV, Arraes SMAA, Pereira DS, Lonardoni MVC, Dias MLGG, Ramos M, Bertolini DA, Fressatti R, Misuta NM, 1990. Avaliação da reação de imunofluorescência indireta para leishmaniose tegumentar americana em pacientes da região noroeste do Estado do Paraná – Brasil. *Rev Unimar* 12: 177--188.
- Silveira TGV, Teodoro U, Lonardoni MVC, Toledo MFO, Filho DV, Bertolini DA, Arraes SMAA, Guilherme AL, 1996. Investigação sorológica em cães de área endêmica de leishmaniose tegumentar, no Estado do Paraná, sul do Brasil. *Cad Saúde Pública* 12: 89--93.
- Silveira TGV, Arraes SMAA, Bertolini DA, Teodoro U, Lonardoni MAC, Roberto ACBS, Ramos M, Sobrinho AN, Ishikawa E, Shaw J, 1999. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. *Rev Bras Med Trop* 32: 413--423.
- Uliana SRB, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM, 1994. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *J Eukaryot Microbiol* 41: 324--330.
- Velasquez LG, Membrive N, Membrive H, Rodrigues J, Reis N, Lonardoni MV, Teodoro U, Tessmann IP, Silveira TGV, 2006. PCR in the investigation of Canine American tegumentary leishmaniasis in Northwestern Paraná State, Brazil. *Cad Saúde Pública* 22: 571--578.
- Venazzi EA, Roberto AC, Barbosa-Tessmann IP, Zanzarini PD, Lonardoni MV, Silveira TG, 2006. Polymerase chain reaction with lesion scrapping for the diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 427--430.

Weigle K, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker D, 2002. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. *J Clin Microbiol* 40: 601--606.

White T, Madej R, Persing D, 1992. The polymerase chain reaction: clinical applications. *Adv Clin Chem* 29: 161--196.

World Health Organization - WHO. Disponível em: <http://www.who.int/Leishmaniasis/en/>  
(Acessado em 15/01/2009)



**Figura 1.** PCR usando como molde DNA de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1987/M11272) diluído seriadamente. Oligonucleotídeos iniciadores 13A-13B. B: Oligonucleotídeos iniciadores LBR1-LBF1. C: Oligonucleotídeos iniciadores LU5A-LB3C. D: Oligonucleotídeos iniciadores MP3H-MP1L. E: Oligonucleotídeos iniciadores B1-B2. M: Marcador molecular de 100pb (Invitrogen®, USA).

**Tabela 1.** Protocolos utilizados nas reações em cadeia da polimerase

Característica	MP3H-MP1L	B1-B2	LU5A-LB3C	LBF1-LBR1	13A-13B
Produto de PCR	Minicírculo do kDNA do subgênero <i>L.</i> <i>(Viannia)</i> (70pb)	Minicírculo do kDNA de <i>Leishmania</i> spp. (750pb)	Seqüência Lider do RNA do complexo <i>L. braziliensis</i> (146-149pb)	Minicírculo do kDNA de <i>L. (V.) b.</i> (536pb)	Minicírculo do kDNA de <i>L.</i> <i>(Viannia)</i> (120pb)
Amplificação					
Desnaturação inicial	95°C - 5 min	95°C - 5 min	95°C - 5 min	95°C - 5 min	95°C - 5 min
Desnaturação	95°C - 1,5 min	95°C - 1,5 min	95°C - 1,5 min	95°C - 1,5 min	95°C - 1,5 min
Anelamento	57°C - 1,5 min	60,5°C - 1,5 min	55°C - 1,5 min	58°C - 1,5 min	57°C - 1,5 min
Polimerização	72°C - 2 min	72°C - 2 min	72°C - 2 min	72°C - 2 min	72°C - 2 min
Nº de ciclos	30	35	30	26	30
Polimerização final	72°C - 10 min	72°C - 10 min	72°C - 10 min	72°C - 10 min	72°C - 10 min
Gel de eletroforese (%)	3	1	2	1,2	2
Sensibilidade analítica da PCR (fg/µL)	1	2	128	32 x 10 <sup>3</sup>	256 x 10 <sup>3</sup>



**Tabela 2.** Resultados da Reação em cadeia da polimerase com os diferentes pares de oligonucleotídeos iniciadores em amostras biológicas de cães e humanos com lesões sugestivas de LTA, conforme diagnóstico por técnicas convencionais.

Grupos	Materiais	Iniciadores (NP/NT)				
		MP3H- MP1L	B1- B2	LU5A- LB3C	LBF1- LBR1	13A- 13B
Cães PA +/ IFI +	Escarificação e biópsia	8/8	4/8	2/8	0/8	0/8
Cães PA -/ IFI -	Sangue	15/18	14/18	6/18	5/18	6/18
Humanos PA +/ IFI +	Escarificação	27/27	27/27	26/27	15/27	6/27
Humanos PA -/ IFI -	Escarificação	12/20	7/20	0/20	0/20	0/20

PA, pesquisa de formas amastigotas; IFI, imunofluorescência indireta; (+), teste positivo; (-), teste negativo; NP, número de amostras positivas; NT, número total de amostras

MODELO

**Artigo 2: “DETECÇÃO DE INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania (Viannia)* EM  
*Nyssomyia neivai* UTILIZANDO MÚLTIPLA-PCR, NO ESTADO DO PARANÁ”**

**DETECÇÃO DE INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania (Viannia)* EM *Nyssomyia neivai* UTILIZANDO MÚLTIPLA-PCR, NO ESTADO DO PARANÁ**

Diego M. Oliveira<sup>1</sup>, Kárin R. R. Castro<sup>2</sup>, Marcos V. Z. Bernal<sup>3</sup>, Cristiane M. O. Legriffon<sup>1</sup>,

Maria V. C. Lonardoni<sup>2</sup>, Ueslei Teodoro<sup>2</sup> e Thaís G. V. Silveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde; <sup>2</sup> Departamento de Análises Clínicas;

<sup>3</sup> Acadêmico de Graduação em Farmácia; Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

Endereço para correspondência: Universidade Estadual de Maringá. Departamento de

Análises Clínicas (DAC) – Av. Colombo 5790 CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil

## **RESUMO**

A infecção natural em flebotomíneos por *Leishmania* em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana (LTA) foi analisada pela técnica da múltipla-reação em cadeia da polimerase (múltipla-PCR). Os flebotomíneos foram capturados com armadilhas luminosas de Falcão em área endêmica do Município de Doutor Camargo, durante os meses de março, abril e julho de 2008. Foram analisados 1.428 flebotomíneos (1.278 fêmeas e 150 machos), sendo 1.386 (97,1%) da espécie *Nyssomyia neivai* (Pinto) e 42 (2,9%) da espécie *N. whitmani* (Antunes & Coutinho). As análises pela múltipla-PCR mostraram a presença de *Leishmania (Viannia)* em 3/130 “pools” de flebotomíneos, indicando uma taxa de infecção de 0,23%. Este trabalho mostra a infecção natural por *Leishmania (Viannia)* em *Nyssomyia neivai* no Estado do Paraná e a múltipla-PCR como importante ferramenta na pesquisa de infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos.

**Palavras-chave:** Leishmaniose, PCR, *Leishmania*, flebotomíneos

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma das doenças infecto-parasitárias de maior incidência no mundo, com aproximadamente 12 milhões de pessoas infectadas em 88 países e 350 milhões que vivem em áreas de risco (WHO, 2009). A doença apresenta duas formas básicas de expressão, a leishmaniose cutânea e a leishmaniose visceral, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da resposta imune do indivíduo (WHO, 2009). Do total de casos de leishmaniose tegumentar registrados no mundo, 90% ocorreram na República Islâmica do Irã, Arábia Saudita, Sudão, Argélia, Afeganistão, Brasil e Peru (WHO, 2009). Atualmente, as leishmanioses têm uma distribuição geográfica mais ampla do que há algumas décadas, sendo relatada em áreas anteriormente não endêmicas (Desjeux, 2001). Entretanto, existem dificuldades para distinguir o número real de casos de um falso aumento devido a melhor detecção, maior precisão nos relatos e/ou acesso facilitado ao tratamento (Desjeux, 2001).

A incidência da leishmaniose tegumentar americana (LTA) vem crescendo na América Latina, principalmente no Brasil, onde foram registrados 634.914 casos no período de 1980 a 2006. Destes, 14.129 foram notificados na Região Sul, dos quais 13.762 (97,4%) ocorreram no estado do Paraná (Ministério da saúde, 2009). A incidência elevada e ampla distribuição geográfica mostram a importância da LTA, além do que, essa doença pode assumir formas com lesões destrutivas, desfigurantes e incapacitantes, com repercussão no campo psicossocial do indivíduo (Gontijo, 2003).

No Brasil, o ciclo de transmissão de *Leishmania* envolve poucas das aproximadamente 800 espécies de flebotomíneos existentes no mundo (Aguiar & Medeiros, 2003). Os estudos realizados no norte do Paraná mostram que as espécies *Migonemyia migonei* (França), *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho), *Pintomyia pessoai* (Coutinho & Barretto), *Pintomyia fischeri* (Pinto) e *Nyssomyia neivai* (Pinto) estão sempre presentes e podem ter relevância na epidemiologia da LTA (Teodoro *et al.*, 2001; 2003; 2004; 2007; Membrive *et*

*al.*, 2004; Reinhold-Castro *et al.*, 2008). A detecção e identificação de espécies de *Leishmania* em flebotomíneos naturalmente infectados são importantes para a prevenção da doença em áreas endêmicas (Kato *et al.*, 2005). A taxa de infecção de vetores naturalmente infectados em áreas endêmicas e a correta identificação do agente etiológico é muito importante na epidemiologia das leishmanioses (Michalsky *et al.*, 2002). Luz *et al.* (2000) constataram pela primeira vez, no Estado do Paraná, a infecção de *N. whitmani* por *Leishmania braziliensis*, mostrando a necessidade de novos estudos para detectar a infecção natural em outras espécies de flebotomíneos freqüentemente encontradas nas áreas endêmicas, que podem estar envolvidas na epidemiologia da LTA neste estado. O objetivo deste trabalho foi detectar a infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos de região endêmica do Paraná utilizando múltipla-reação em cadeia da polimerase.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Área de estudo.** Este estudo foi desenvolvido numa área de lazer (Recanto Marista), no município de Doutor Camargo (52°13' Longitude Oeste e 23°33' Latitude Sul), que se insere na Mesorregião Norte-Central Paranaense. O Recanto Marista localiza-se às margens do rio Ivaí, com 57,6 hectares, dos quais 40,8 hectares são cobertos por mata do tipo floresta estacional semidecidual que, apesar de ter sofrido grandes alterações, ainda é habitada por aves e mamíferos silvestres (Teodoro *et al.*, 2001).

**Coleta de flebotomíneos.** As coletas foram realizadas em três diferentes ocasiões, ou seja, março de 2008, das 20 às 24 h, abril de 2008, das 21 às 5 h, e julho de 2008, entre 1 e 6 h. Para tal, foram utilizadas armadilhas luminosas de Falcão, nos seguintes ecótopos:

Ecótopo 1 (E1): num galinheiro desativado ao lado direito do alojamento, dentro da mata (4 horas);

Ecótopo 2 (E2): na margem do rio, ao lado da mata (no topo de uma escada que desce até a margem do rio) (13 horas);

Ecótopo 3 (E3): nos fundos de uma residência eventualmente alugada para visitantes (17 horas);

Ecótopo 4 (E4): na entrada principal de um alojamento, às margens do rio Ivaí, usado por grupos de pessoas que procuram retiro espiritual (9 horas);

**Identificação dos flebotomíneos.** Os insetos foram processados no laboratório de entomologia do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá da seguinte forma: após serem mortos com clorofórmio, foram acondicionados em frascos tipo eppendorf contendo isopropanol, para sua conservação e posterior identificação (Paiva *et al.*, 2007). Para este fim, em microscópio estereoscópio, os insetos a serem identificados foram depositados sobre lâminas lavadas com hipoclorito a 2% e desinfetadas em álcool a 70%. Nas lâminas foram colocadas duas gotas de salina estéril (0,9%); com auxílio de estiletos, na primeira gota foram retiradas as patas e as asas do inseto e na segunda gota, no caso de fêmeas, foram feitos dois pequenos cortes na porção final do abdômen com objetivo de expor a espermateca, o qual era coberto com lamínula e examinado ao microscópio óptico, com aumento de 200 vezes, para identificação da espécie dos flebotomíneos. A nomenclatura das espécies de flebotomíneos seguiu Galati (2003). Os insetos, após a identificação, foram conservados em frascos tipo *eppendorf* contendo isopropanol, cada com 8 a 10 espécimes, no caso de fêmeas ou 50 espécimes, no caso de machos, para posterior extração do DNA.

**Extração de DNA de flebotomíneos.** As extrações foram realizadas em “pools” de 8 a 10 flebotomíneos por tubos. Para obtenção do DNA os insetos foram macerados com espátula estéril em 20µL tampão de lise/inseto (50mM NaCl, 10mM EDTA, pH 8,0, 50mM Tris-HCL pH 7,4, Triton X100 1% e 10mM DTT), seguido por 3 ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (60°C). Esse macerado foi incubado por 1 hora a 60°C

e por mais 3 horas a 60°C com a adição de 1µL/inseto proteinase K (20mg/mL), 80µL/inseto de tampão de lise e 1%/inseto de Triton X100. Após a incubação, foram adicionados 300µL de solução de isotiocianato de guanidina e fenol (GT) (isotiocianato de guanidina 5M:fenol equilibrado; v/v) e homogeneizado vigorosamente. Foram acrescentados 50µL de clorofórmio gelado e homogeneizado delicadamente. A amostra foi centrifugada por 10 min a 9300g e ao sobrenadante, transferido para outro tubo, foram acrescentados 300µL de etanol absoluto gelado para precipitação do DNA. O material foi centrifugado por 15 min a 9300g e o sedimento foi lavado por mais 2 vezes com 300µL de etanol absoluto gelado por centrifugação (10 min/9300g). O DNA foi seco em termobloco (BIOPLUS IT-2002) a 95°C, ressuspendido em 20µL de H<sub>2</sub>O destilada e estocado a 4°C até o uso.

**Cultivo de *Leishmania*.** Formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1987/M11272) foram cultivadas em meio 199 (Invitrogen<sup>®</sup>, EUA) contendo 10% de soro bovino fetal (Invitrogen<sup>®</sup>, EUA), 1% de L-glutamina<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>, EUA) e 1% de urina humana, a 25°C em estufa B.O.D. (Logen Scientific, Brasil), até a fase estacionária de crescimento.

**Extração de DNA de *Leishmania*.** Os parasitos (aproximadamente 50mL de cultura) foram lavados 4 vezes por centrifugação (1.600g por 10min) em solução salina tamponada (SST). O sobrenadante foi descartado e o DNA extraído do sedimento pelo método guanidina-fenol (Venazzi *et al.*, 2006). O DNA foi quantificado pelo Kit Qubit<sup>™</sup> fluorometer (Invitrogen<sup>®</sup>, EUA) e diluído para os testes de sensibilidade dos iniciadores na PCR e controle positivo da reação.

**Hot-start múltipla-PCR e PCR convencional.** Para amplificação do DNA por múltipla-PCR foram utilizados dois pares de iniciadores. Os iniciadores MP3H (5'-GAACGGGGTTTCTGTATGC-3') e MP1L (5'-TACTCCCCGACATGCCTCTG-3') foram empregados para amplificação do fragmento de 70pb da região conservada do DNA do

minicírculo do cinetoplasto (kDNA) do subgênero *Leishmania* (*Viannia*). (Lopez *et al.*, 1993). O segundo par de iniciador amplifica um fragmento de 220pb da região do gene *IVS6* da cacofonia em insetos do gênero *Lutzomyia*: 5Llac (5'-GTGGCCGAACATAATGTTAG-3') e 3Llac (5'-CCACGAACAAGTTCAACATC-3') (Lins *et al.*, 2002). A mistura de reação da PCR foi realizada com volume final de 25 µl, contendo 0,5 µM de cada um dos iniciadores (Invitrogen<sup>®</sup>, Brasil), 0,2 mM de dNTP (Invitrogen<sup>®</sup>, EUA), 1U de Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (Invitrogen<sup>®</sup>, EUA), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 X Tampão de enzima e 2µL de DNA molde. A amplificação foi realizada em Termocicladora PC (Biometra, Alemanha) a 94°C por 7 min para ativação da enzima (hot-start PCR), seguido por 30 ciclos, cada um consistindo de 1min e 30s a 95°C, 1min e 30s a 57°C e 2min a 72°C. Após o último ciclo, a extensão foi continuada por mais 10min a 72°C. O produto de amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídeo (0,1 µg/mL), a 10-15 V/cm. Para cada 5 amostras foram adicionados um controle positivo e um controle negativo. Após a corrida, a presença de bandas foi verificada em transiluminador (Macro Vue UV-20 Hoefer).

Para a PCR convencional foram utilizados os iniciadores B1 (5'-GGGGTTGGTGTAATATAGTGG-3') e B2 (5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3') que amplificam região do minicírculo do kDNA de todas as espécies de *Leishmania* (De Bruijn & Baker, 1992). A mistura de reação continha volume total de 25µL, sendo 1µM dos iniciadores (Invitrogen<sup>®</sup>, Brasil), 0,2 mM de dNTP (Invitrogen<sup>®</sup>, EUA), 1U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen<sup>®</sup>, EUA), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 X Tampão de enzima e 2µL de DNA extraído. A amplificação do DNA foi realizada com temperatura inicial de 95 por 5min, seguida por 35 ciclos de 1min e 30s a 95°C, 1min e 30s a 60,5°C e 2min a 72°C, e extensão final por 10min a 72°C.

O produto de amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose, corado pelo brometo de etídeo 0,1 µg/mL, a 10-15 V/cm. Para cada 5 amostras foram adicionados um



controle positivo e um controle negativo. A presença de bandas foi verificada em transiluminador (Macro Vue UV-20 Hoefer).

**Ensaio de sensibilidade da PCR.** Para determinar o limiar de detecção de DNA pela PCR, foi realizada extração de DNA de um “pool” de 50 flebotomíneos machos seguido pela quantificação pelo Kit Qubit™ fluorometer (Invitrogen®, EUA) e diluição serial. Foram realizadas análises da PCR quanto a sensibilidade analítica dos iniciadores 5Llcac-3Llcac. Para a sensibilidade analítica da PCR com os iniciadores MP3H-MP1L foi usando como molde DNA de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1987/M11272) diluído serialmente. Para a sensibilidade de técnica da múltipla-PCR foram adicionados 192 pg/μL de DNA de flebotomíneos machos a cada diluição de DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5 fg/μL).

Também foi realizada PCR usando como molde DNA de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1987/M11272) diluído serialmente para determinar a sensibilidade analítica dos iniciadores B1-B2.

## RESULTADOS

Foram analisados 1.428 flebotomíneos, dos quais 1.278 eram fêmeas e 150 machos, constatando-se as seguintes espécies: *Nyssomyia neivai* (Pinto) e *N. whitmani* (Antunes & Coutinho), com 1.386 (97,1%) e 42 (2,9%) exemplares respectivamente.

A tabela 1 mostra os ecótopos onde foram capturados os flebotomíneos analisados pela PCR. Do total de fêmeas pesquisadas, apenas 38 insetos eram da espécie *N. whitmani*.

A sensibilidade analítica dos iniciadores MP3H-MP1L e 5Llcac-3Llcac, testados individualmente pela PCR convencional, foi de 1 fg/μL de DNA de *Leishmania (Viannia)* (Figura 1A) e 6 pg/μL de DNA de *N. neivai* (Figura 1B), respectivamente. Entretanto, quando testados em conjunto pela múltipla-PCR o limiar de detecção foi de 8 fg/μL de DNA do

subgênero *Leishmania* (*Viannia*) (Figura 1C). O par de iniciador B1-B2 apresentou detecção de 2 fg/ $\mu$ L de DNA de *Leishmania* spp pela PCR convencional (Figura 1D).

Foram realizadas análises por meio da múltipla-PCR de todas as fêmeas de flebotomíneos capturados. Nenhuma das amostras de DNA de flebotomíneos testadas apresentou interferências perceptíveis por inibidores da *Taq* DNA polimerase.

Os resultados obtidos pela técnica de múltipla-PCR mostraram presença de *Leishmania* (*Viannia*) em 3/130 “pools” de flebotomíneos testados (Figura 2A.). Estes resultados foram confirmados pela PCR convencional usando os iniciadores B1-B2 (Figura 2B). A taxa de infecção, considerando 1 flebotomíneo infectado em cada pool, foi de 0,23% ou 3/1278 fêmeas analisadas. Todos os “pools” positivos foram de flebotomíneos da espécie *N. neivai*.

## DISCUSSÃO

Em grande parte dos estudos realizados para pesquisa de infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos, estes devem ser dissecados para este fim, e para posterior PCR. Para tanto, os insetos devem ser processados logo após sua coleta (preferencialmente nas primeiras horas), por sua pouca resistência fora de seu ambiente natural e inviabilidade de realização do procedimento após a morte do flebotomíneo por tempo prolongado. Neste estudo não foi realizada dissecação para a observação de infecção natural por *Leishmania* nos flebotomíneos. Os insetos coletados foram conservados em isopropanol (Paiva *et al.*, 2007), permitindo a coleta de um grande número de espécimes e a possibilidade de manter seu DNA preservado de forma adequada, para seu posterior manuseio.

Para a extração do DNA foi utilizado o inseto inteiro (apenas retiradas as patas e as asas) e não apenas o tubo digestório. Paiva *et al.*, (2007) demonstraram que, para este fim, a utilização do inseto inteiro apresentou melhores resultados do que apenas o tubo digestório.

Quanto à validação do protocolo de extração de DNA de flebotomíneo, foi levada em consideração a quantidade de DNA obtido e a redução dos inibidores da reação, o que foi confirmado pelos resultados da múltipla-PCR mesmo utilizando insetos inteiros.

O uso da PCR em flebotomíneos capturados no campo é um procedimento útil para determinar a infecção por *Leishmania* em grande número de amostras, identificando vetores suspeitos das leishmanioses (Perez *et al.* 1994, Rodríguez *et al.* 1999). Além disso, é mais específica e sensível que a dissecação dos flebotomíneos (Felicangeli *et al.*, 1988) e que outros métodos convencionais de diagnóstico em pacientes (Rodríguez *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003).

A sensibilidade de detecção de DNA do subgênero *Leishmania* (*Viannia*) encontrada quando da utilização do iniciador MP3H-MP1L foi de 1 fg/ $\mu$ L de DNA, provando ser muito sensível, resultado semelhante ao encontrado por Lopes *et al.* (1993) e Velasquez *et al.* (2006), que detectaram 0,14 fg/ $\mu$ L e 0,9 fg/ $\mu$ L de DNA, respectivamente. A sensibilidade analítica da PCR convencional, utilizando para amplificação o par de iniciador B1-B2, foi de 2 fg/ $\mu$ L de DNA, próximo a detecção de 1 fg/ $\mu$ L encontrada por De Bruijn & Baker (1992).

Para verificar a presença de prováveis interferentes no conteúdo digestório dos insetos que poderiam causar inibição da *Taq* DNA polimerase e impedir a detecção de DNA de *Leishmania*, foi utilizado o par de iniciador que amplifica o gene da cacofonia em *Lutzomyia* como controle interno de amplificação. O gene da cacofonia em *Lutzomyia* tem sido demonstrado como importante controle interno da atividade da enzima polimerase (Pita-Pereira *et al.*, 2005).

Embora, o ensaio de múltipla-PCR tenha apresentando sensibilidade analítica inferior aos dos iniciadores MP3H-MP1L na PCR convencional, este ainda foi considerado altamente sensível para a detecção de DNA do subgênero *Leishmania* (*Viannia*). Além disso, mais vantajoso por apresentar um par de iniciador com função de controle interno da reação, já que

os insetos possuem em seus tecidos inibidores que podem diminuir a eficiência da reação de PCR, majoritariamente em seu exoesqueleto, cabeça e tórax (Higgins *et al.*, 1995; Siridewa *et al.*, 1996).

Os resultados do teste de múltipla-PCR para detecção de *Leishmania (Viannia)* mostraram positividade em 3/130 (2,3%) “pools” de flebotomíneos, análise que foi confirmada pela PCR convencional utilizando os iniciadores B1-B2, que amplificam região do minicírculo do kDNA de todas as espécies de *Leishmania*. A taxa de infecção foi, considerando 1 flebotomíneo infectado em cada pool, de 0,23% ou 3/1278 fêmeas analisadas.

Os flebotomíneos infectados foram capturados nos ecótopos E2 (margem do rio) e E4 (alojamento). Os dois locais são próximos a mata ciliar, onde vivem pequenos mamíferos silvestres, possíveis reservatórios naturais de *Leishmania*. Este fato pode explicar o encontro de flebotomíneos naturalmente infectados pelo protozoário pesquisado.

Apesar de a LTA ter caráter endêmico no Paraná, a investigação da infecção em flebotomíneos tem sido pouco estudada. O primeiro isolamento e identificação de *L. braziliensis* em flebotomíneos neste Estado foi realizado por Luz *et al.*, (2000) que encontraram 3 (0,18%) fêmeas de *N. whitmani*, naturalmente infectadas por *L. braziliensis*, de um total de 1.612 fêmeas de flebotomíneos dissecados, provenientes do município de Cambira, no norte do Paraná. No município de Adrianópolis, no Paraná, Castro *et al.* (2005) não detectaram a infecção por *Leishmania* em 2.559 fêmeas dissecadas, das espécies *N. intermedia* (2.530), *M. migonei* (11), *P. fischeri* (15) e *N. whitmani* (3). Cabe lembrar que no Paraná os parasitos isolados da maioria dos casos de LTA humana e canina, têm sido identificados como *L. (Viannia) braziliensis* (Lonardoní *et al.*, 1993; Silveira *et al.*, 1999).

A PCR tem sido bastante empregada no estudo de infecção natural ou experimental de flebotomíneos, utilizando diversos iniciadores (Pérez *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1999; Aransay *et al.*, 2000; Michalsky *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2002; Pita-Pereira *et al.*, 2005;

Kato *et al.*, 2005; Jorquera *et al.*, 2005). No Estado do Paraná usando dissecação e PCR convencional Neitzke *et al.*, (2008) analisaram 2.487 fêmeas e Scodro *et al.*, (2008) 2213 fêmeas, cuja maioria eram *N. neivai* e não detectaram infecção. No Estado do Rio de Janeiro, analisando 40 *pools* de fêmeas por múltipla-PCR e hibridização foram encontrados *N. intermedia* (5/32) e *M. migonei* (3/5) infectados com *L. braziliensis*, resultando em uma taxa de infecção de 2% dos insetos (Pita-Pereira *et al.*, 2005).

Embora a detecção de infecção pelas reações de PCR não permitam atender os requisitos para a incriminação vetorial propostos por Killick Kendrick & Ward (1981), as infecções experimentais de *N. intermedia* (Silva & Gomes, 2001) mostraram sua susceptibilidade às cepas de *L. braziliensis* e suas localizações no trato digestório. Este fato, somado à epidemiologia da LTA, indicam que os flebotomíneos do complexo *N. intermedia s.l.* podem ter um papel importante na epidemiologia da leishmaniose (Marcondes, 1996).

Este é o primeiro relato de infecção natural por *Leishmania* do subgênero *Leishmania* (*Viannia*) em *N. neivai* no Estado do Paraná, utilizando uma técnica de múltipla-PCR. Outro resultado positivo de infecção natural em *N. neivai* foi relatado por Marcondes *et al.* (2009) em Santa Catarina, utilizando as técnicas de PCR e Southern blot hibridização. Além disso, no noroeste da Argentina, Córdoba-Lanús *et al.* (2006), utilizando PCR e hibridização, também detectaram infecção por *Leishmania* (*Viannia*) na espécie *N. neivai*.

A espécie de flebotomíneo *N. neivai* tem sido predominante no Recanto Marista (Teodoro *et al.*, 2001, 2003, 2007; Reinhold-Castro *et al.*, 2008), onde ocorreram casos autóctones de LTA, que foram detectados espécimes infectadas. Considerando estes fatos e a existência de outros relatos de infecção natural desta espécie, comprova-se a importância de *N. neivai* na epidemiologia da LTA.

Este trabalho mostra que a múltipla-PCR contendo um controle interno de amplificação é uma ferramenta importante para detecção de infecção natural por *Leishmania* em

flebotomíneos e que *N. neivai* tem um importante papel na transmissão de *Leishmania* (*Viannia*) também no Estado do Paraná.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer à Fundação Araucária e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Processo 410550/2006-0) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

### **REFERÊNCIAS**

- Aguiar, GM, Medeiros, WM. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: EF, Rangel, R Lainson, ed. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: editora Fiocruz; 2003:207-256.
- Aransay, AM, Scoulica, E, Tselentis, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:1933-1938.
- Castro, EA, Luz, E, Telles, FQ, Pandey, A, *et al*. Eco-epidemiological survey of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. *Acta Trop* 2005; 93:141-149.
- Córdoba-Lanús, E, De Grosso, ML, Piñero, JE, Valladares, B, *et al*. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp in northwestern Argentina. *Acta Trop* 2006; 98:1-5, Issue 1.
- De Bruijn, MHL, Barker, DC. Diagnosis of new world leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop* 1992; 52:45-58.

- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95:239-243.
- Feliciangeli, MD, Reyes, RM, Limongi, JE. Natural infection of *Lutzomyia ovallesi* (Díptera: Psychodidae) with parasites of the *Leishmania braziliensis* complex in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in northern Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83:393-394.
- Galati, EAB. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson, R, ed. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003:23-51.
- Gontijo, B, Carvalho, MLR, 2003. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36:71-80.
- Higgins, JA, Azard, AF. Use of polymerase chain reaction to detect bacteria in Arthropods: a review. *J Med Entomol* 1995; 32:213-222.
- Jorquera, A, Gonzalez, R, Marchán-Marcano, E, Milagros, O, *et al*. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:45-48.
- Kato, H, Uezato, H, Katakura, K, Calvopiña, M, *et al*. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72:87-93.
- Killick-Kendrick, R, Ward, RD. Ecology of *Leishmania*. *Parasitol* 1981; 82:143-152.
- Lins, RM, Oliveira, SG, Souza, NA, de Queiroz, RG, *et al*. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. *Insect Mol Biol* 2002; 11:117-122.
- Lonardoní, MVC, Teodoro, U, Arraes, SMAA, Silveira, TGV, *et al*. Nota sobre leishmaniose canina no noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil. *Rev Saúde Pública* 1993; 27:378-379.

- Lopez, M, Ingá, R, Cangalaya, M, Echevarria, J, *et al.* Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49:348-356.
- Luz, E, Membrive, N, Castro, EA, Dereure, J, *et al.* *Lutzomyia whitmani* (Díptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V). braziliensis* in Paraná State, Southern Brazil. *An Trop Med Parasitol* 2000; 94:623-631.
- Marcondes, CB. Redescription of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz and Neiva, 1912), and resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 97:457-462.
- Marcondes, CB, Bittencourt, IA, Stoco, PH, Eger, I, *et al.* Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Díptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia) spp.* in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; “*in press*”.
- Membrive, NA, Rodrigues, G, Membrive, U, Monteiro, WM, *et al.* Flebotomíneos de municípios do Norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. *Entomol Vect* 2004; 11:673-680.
- Michalsky, EM, Fortes-Dias, CL, Pimenta, PFP, Secundino, NFC, *et al.* Avaliação do PCR na investigação de *Leishmania spp* em flebotomíneos experimentalmente infectados (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2002; 44:255-259.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1980 - 2005. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela\\_lva\\_casos\\_brasil.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_lva_casos_brasil.pdf) (Acessado em 15/01/2009).
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2006. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela\\_lva\\_casos\\_brasil.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_lva_casos_brasil.pdf) (Acessado em 15/01/2009).



- Miranda, JC, Reis, E, Schiefer, A, Gonçalves, M, *et al.* Frequency of infection of *Lutzomyia* Phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by Pinpoint Capture and Polimerase Chain Reaction. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97:185-188.
- Neitzke, HC, Scodro, RBL, Reinhold-Castro, KR, Dias, AC, *et al.* Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 2008; 41:17-22.
- Oliveira, CI, Báfica, A, Oliveira, F, Favali, CB, *et al.* Clinical utility of polymerase chain reaction – based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous *Leishmaniasis*. Clin Infect Dis 2003; 37:149-153.
- Paiva, BR, Secundino, NFC, Pimenta, PFP, Galati, EAB, *et al.* Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. Cad Saúde Pública 2007; 23:87-94.
- Perez, JE, Ogusuku, E, Ingá, R, Lopez, M, *et al.* Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp in Peru. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994; 88:161-164.
- Pita-Pereira, D, Alves, CR, Souza, MB, Brazil, RP, *et al.* Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. Trans R Soc Trop Med Hyg 2005; 99:905-913.
- Reinhold-Castro, KR, Scodro, RBL, Dias-Sversutti, AC, Neitzke, HC, *et al.* Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos. Rev Soc Bras Med Trop 2008; 41:269-276.
- Rodriguez, N, Aguilar, CM, Barrios, MA, Barker, DC. Detection of *Leishmania (V.) braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; 93:47-49.

- Rodrigues, EHG, Brito, MEF, Mendonça, MG, Werkhäuser, RP, *et al.* Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3572-3576.
- Scodro, RBL, Reinhold-Castro, KR, Dias-Sversutti, AC, Neitzke-Abreu, HC, *et al.* Investigation of Natural Infection by *Leishmania* in Sandflies of Paraná State, Southern Brazil. *Braz Arch Biol Technol* 2008; 51:483-491.
- Silva, AC, Gomes, AC. Estudo da competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Vianna, 1911). *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34:187-191.
- Silveira, TGV, Arraes, SMAA, Bertolini, DA, Teodoro, U, *et al.* Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. *Rev Bras Med Trop* 1999; 32 413-423.
- Siridewa, K, Karunanayake, EH, Chandrasekharan, NV. Polymerase chain reaction-based technique for the detection of *Wuchereria bancrofti* in human blood samples hydrocele fluid, and mosquito vector. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54:72-76.
- Teodoro, U, Silveira, TGV, Santos, DR, Santos, ES, *et al.* Frequência da fauna de flebotomíneos no domicílio e em abrigos de animais domésticos no peridomicílio, nos municípios de Cianorte e Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. *Rev Patol Trop* 2001; 30:209-223.
- Teodoro, U, Silveira, TGV, Santos, DR, Santos, ES, *et al.* Influência da reorganização, da limpeza do peridomicílio e da desinsetização de edificações na densidade populacional de flebotomíneos, no município de Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2003; 19:1801-1813.
- Teodoro, U, Thomaz-Soccol, V, Kühn, JB, Santos, DR, *et al.* Reorganization and cleanliness of peridomiciliar area to control sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in South

Brazil. *Braz Arch Biol Technol* 2004; 47:205-212.

Teodoro, U, Santos, DR, Santos, AR, Oliveira, O, *et al.* Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos no norte do Estado do Paraná, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2007; 23:2597-2604.

Velásquez, LG, Membrive, N, Membrive, H, Rodrigues, J, *et al.* PCR in the investigation of Canine American tegumentary leishmaniasis in Northwestern Paraná State, Brazil. *Cad Saúde Pública* 2006; 22:571–578.

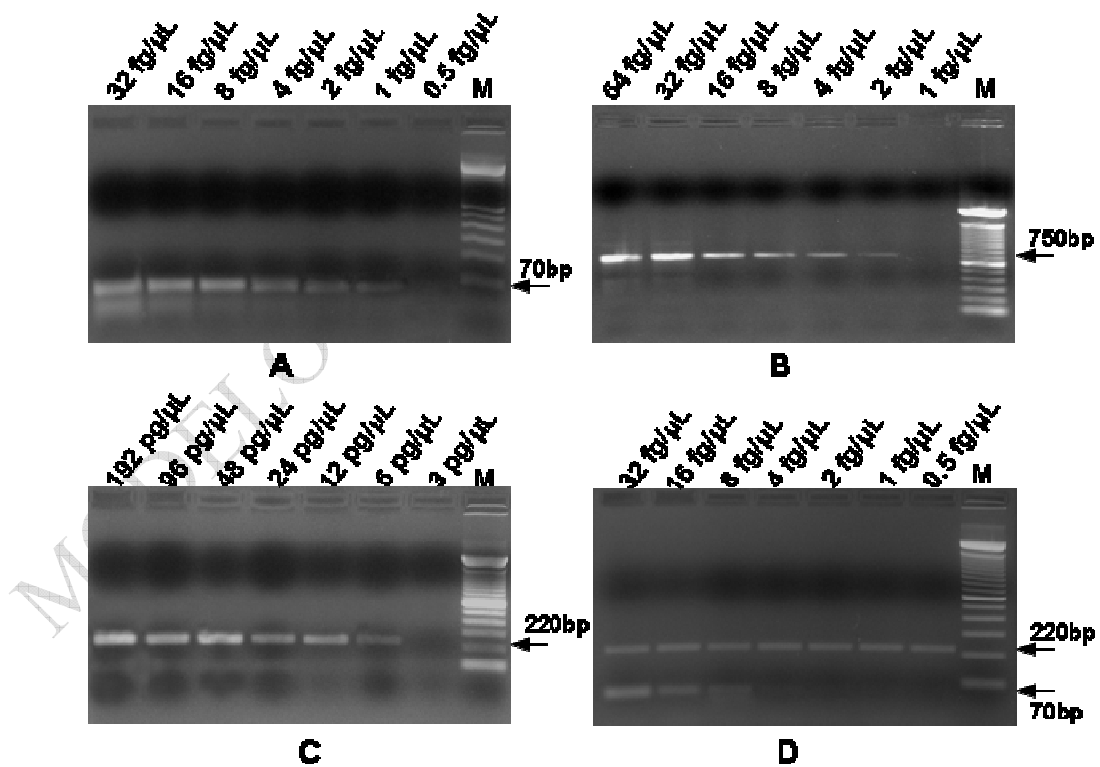
Venazzi, EA, Roberto, AC, Barbosa-Tessmann, IP, Zanzarini, PD, *et al.* Polymerase chain reaction with lesion scrapping for the diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101:427–430.

World Health Organization - WHO. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>  
(Acessado em: 15/01/2009).

**Tabela 1.** Flebotomíneos coletados no Recanto Marista, município de Doutor Camargo, Paraná.

Ecótopo	Fêmeas	Machos	Total
3/2008			
E1	45	8	53
E2	72	18	90
E3	60	14	74
Subtotal	177	40	217
4/2008			
E2	61	zero	61
E3	530	60	590
E4	253	50	303
Subtotal	844	110	954
7/2008			
E2	zero	zero	zero
E3	zero	zero	zero
E4	257	zero	257
Subtotal	257	zero	257
Total	1278	150	1428

*Localização das armadilhas:* E1-galinheiro desativado, E2-margem do rio, E3-fundos/residência, E4-alojamento.

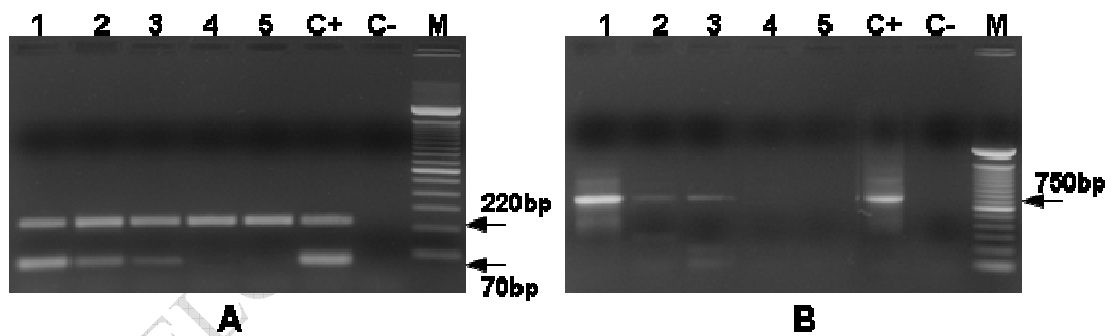


**Figura 1.** Ensaio de sensibilidade analítica da múltipla-PCR e PCR convencional com os distintos iniciadores.

A e D: PCR convencional utilizando os iniciadores MP3H-MP1L e B1-B2, respectivamente.

B: PCR convencional utilizando os iniciadores 5Llac-3Llac.

C: Múltipla-PCR usando como molde DNA de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1987/M11272) diluído serialmente adicionado na mesma proporção a 192 pg/μL de DNA de flebotomíneos machos, amplificados com os pares de iniciador MP3H-MP1L e 5Llac-3Llac.



**Figura 2.** PCR de DNA de flebotomíneos. A: Múltipla-PCR de amostras de DNA de flebotomíneos (1, 2, 3, 4 e 5); B: PCR convencional, com os iniciadores B1-B2, das mesmas amostras submetidas ao múltipla-PCR; Controle positivo (C+); Controle negativo (C-); Marcador molecular de 100pb (M).

### CAPÍTULO III

#### CONCLUSÕES

Este estudo sobre padronização de técnicas moleculares para os estudos de leishmanioses mostrou que:

- 1) Os iniciadores da PCR estudados, direcionados ao diagnóstico e epidemiologia de leishmanioses apresentaram ampla variação quanto a sua sensibilidade analítica.
- 2) A PCR com os diferentes iniciadores estudados mostraram diferença significativa comparados aos métodos convencionais de diagnósticos de LTA.
- 3) A padronização da técnica, a análise da sensibilidade e a escolha de adequados oligonucleotídeos iniciadores são fatores importantes para o bom desempenho da PCR .
- 4) A múltipla-PCR contendo um controle interno de amplificação é uma ferramenta importante para detecção de infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos.
- 5) A infecção natural por *Leishmania* do subgênero *Leishmania* (*Viannia*) em *Nyssomyia neivai* no Estado do Paraná, utilizando uma técnica de múltipla-PCR é relatada pela primeira vez.
- 6) *Nyssomyia neivai* tem um importante papel na transmissão de *Leishmania* (*Viannia*) também no Estado do Paraná.

