

APARECIDA HELENA DE SOUZA GOMES

Contribuição da reação da polimerase em cadeia no diagnóstico e às ações de vigilância epidemiológica das leishmanioses tegumentar e visceral no Estado de São Paulo.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Pereira-Chioccola

**SÃO PAULO
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES

©reprodução autorizada pelo autor

Gomes, Aparecida Helena de Souza

Contribuição da reação da polimerase em cadeia no diagnóstico e às ações de vigilância epidemiológica das leishmanioses tegumentar e visceral no Estado de São Paulo / Aparecida Helena de Souza Gomes - São Paulo, 2008.

Tese (doutor) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientadora: Vera Lucia Pereira-Chiocola

1. Reação em cadeia da polimerase 2. Técnicas e procedimentos de laboratório 3. Leishmaniose visceral 4. Leishmaniose cutânea

SES/CCD/CD-190/08

*Um dia sonhei que poderia ter
Outro dia sonhei que poderia buscar
Hoje sonhei que encontrei*

*Levantei-me... Olhei pro céu.....
e agradei a Deus
por cada dia vivido*

*Os dias difíceis fortaleceram minha fé
exercitaram minha paciência
sucumbiram meu orgulho
encheram-me de esperança
descobri forças que não conhecia
e lutei*

*Os dias fáceis exaltaram minha alegria
inspiraram-me a
ouvir mais
compreender mais
ajudar mais
amar mais
e
recomeçar sempre*

Aos
amores da minha vida

Francisco
Murilo e Thais

Agradecimentos

A minha orientadora Prof. Dra. Vera Lucia P. Chioccola, exemplo de profissionalismo, dedicação, paciência e perseverança. Por acreditar e depositar em mim sua confiança e amizade e conduzir-me nesta caminhada tão importante da minha vida profissional e pessoal.

A Izabel e Sueli, pela colaboração prestada neste trabalho e pela dedicação com que conduziram as atividades da área de Parasitologia (IAL-Sorocaba) na minha ausência.

Aos meus colegas do laboratório de Biomol e Pós Graduação, em especial Izabelle, Thais, Cristina, Fábio, Rafael, Fátima, Elaine, Marcia e Margareth pela colaboração nos ensaios laboratoriais; pela alegria e energia que a convivência com vocês me proporcionou, vocês nem imaginam...

A amiga Eliani de Araújo (ex-diretora do IAL de Sorocaba), pela sua amizade, companheirismo, paciência e incentivo em todas as etapas desta caminhada.

A todos os colegas do IAL- Sorocaba, Kátia, Marilym, Ângela, Lourdes Burini, Lourdes Shikama, Yara, Marina Reigota, Helô, enfim todos aqueles que torceram por mim e incentivaram-me com muita energia positiva.

Aos colegas do laboratório de Enteroparasitoses e Parasitoses Sistêmicas (IAL-SP), pela recepção calorosa, pelos momentos de alegria, força e carinho que tornaram minhas idas e vindas (viagens) menos sacrificantes.

Emiliana, Tirces, Liriam e Elaine (CPG–CCD-PLSP) pela atenção, paciência e carinho com que sempre me trataram, vocês são maravilhosas.

Dra. Maria de Lourdes P. Barbo, PUC-Sorocaba, pela realização das análises histopatológicas e pelo incentivo recebido nesta caminhada.

Dras. Heloisa e Marta (Policlínica-Sorocaba), pela colaboração e incentivo na realização deste trabalho.

Aos profissionais da Saúde, em especial enfermeira Edna Penha Martins (CVE-Estadual) e dos municípios da DRS-16 (Sorocaba), pela colaboração neste trabalho.

Aos colegas da SUCEN - Sorocaba, em especial Simone, Silvio e Sueli pela colaboração e incentivo recebidos na realização deste trabalho.

À banca de qualificação: Drs. Marcos V. Silva, Adele C.de Araújo e Clara L.B. Mestriner, por toda a atenção e paciência nas correções e sugestões tão bem colocadas durante a apresentação deste trabalho.

À banca de defesa: Drs. José Eduardo Tolezano, Valdir Sabbaga Amato, Eunice Aparecida Galati e Clara L. B. Mestriner, pela presença, atenção, paciência e pelas sugestões colocadas, que com certeza contribuíram para tornar este trabalho muito melhor.

A minha amiga Dra. Janete Kawasima pelo seu carinho, amizade e indicação dos florais de Bach e pelas seções de acupuntura, que muito me beneficiaram, ajudando-me principalmente nos momentos mais difíceis.

A toda minha família, meus pais, irmãos, cunhadas, sobrinhos e sogros pelo apoio e compreensão pelas ausências e pouca atenção em algumas ocasiões.

Agradecimentos

Este trabalho teve apoio financeiro da FAPESP - Processo nº. 04/13192-6

Resumo

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que apresentam diferentes manifestações clínicas e grande diversidade epidemiológica. O objetivo deste estudo foi o de padronizar a PCR, para diferenciar *L. (L.) chagasi* de *L. (V.) braziliensis* em amostras biológicas, visto que ambas as espécies são prevalentes no Estado de São Paulo. Este trabalho foi dividido em três partes. A primeira restringiu-se à escolha e avaliação dos marcadores específicos e à padronização da reação. Na segunda, avaliou-se a PCR (PCR-*L. (L.) chagasi*) utilizando um marcador específico para o diagnóstico da leishmaniose visceral americana (LVA) em 114 amostras caninas (44 cães sintomáticos e 70 assintomáticos) em um estudo prospectivo. A sensibilidade e especificidade da reação foram avaliadas a partir dos métodos parasitológicos (microscopia direta e cultura *in vitro*). Houve 92% de concordância entre os métodos parasitológicos e a PCR-*L. (L.) chagasi*. Das 61 amostras positivas na PCR-*L. (L.) chagasi*, 49 foram positivas pelos métodos parasitológicos. A especificidade também foi alta, pois não foram observadas reações positivas com outras espécies utilizadas no controle. Nas amostras negativas de 61 cães os métodos parasitológicos foram positivos em 5 dessas amostras. Esses resultados discordantes revelaram que estes animais poderiam estar com leishmaniose tegumentar americana (LTA), o que foi confirmado pela PCR-*L. (V.) braziliensis* positiva. Na terceira parte avaliou-se a PCR-*L. (V.) braziliensis* em lesões humanas. As amostras analisadas foram coletadas de pacientes atendidos em ambulatórios da região de Sorocaba, que é a segunda região de maior endemicidade para LTA no Estado de São Paulo. Biópsias de lesões de 109 pacientes foram analisadas por PCR-*L. (V.) braziliensis*, métodos parasitológicos, reação intradérmica de Montenegro e análise histopatológica. O diagnóstico definitivo da LTA, baseado na análise

clínica e na visualização do parasito, evidenciou 52 pacientes positivos e 57 negativos. A sensibilidade e a especificidade da PCR-L. (*V.*) *braziliensis* foram de 96% e 100% respectivamente. Os métodos parasitológicos apresentaram sensibilidade de 69% e especificidade de 100%. A reação intradérmica de Montenegro foi sensível (100%), mas com baixa especificidade (65%). Estes resultados falso-positivos foram correlacionados a possíveis reações cruzadas com outras infecções ou reação alérgica ao fenol, preservativo presente no antígeno. Este estudo mostrou que a PCR é um método altamente sensível e específico para compor o diagnóstico diferencial das leishmanioses e reforça a idéia da inclusão da PCR no diagnóstico das leishmanioses, visando determinar a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção.

Abstract

Leishmaniasis are infectious diseases with different clinical manifestations and widely epidemiological diversity. The aim of this study was to standardize PCR to distinguish *L. (L.) chagasi* from *L. (V.) braziliensis* in biological samples since both species are prevalent in São Paulo State. This study was separated into three steps. The first was to choose and evaluate specific markers, as well as to establish the reaction standardization. In the second step, we evaluated the PCR (PCR-*L. (L.) chagasi*) ability to diagnose New World visceral leishmaniasis (VL) and to distinguish *L. (L.) chagasi* from other *Leishmania* species in domestic dogs. The reaction was evaluated in 114 dog samples (44 symptomatic and 70 asymptomatic dogs) in a prospective study. Sensitivity and specificity were determined using the results of parasitological methods (culture and microscopic examination). PCR-*L. (L.) chagasi* and parasitological methods were concordant in 92% of samples. VL was confirmed in 49 dogs, while 61 had negative results. Discordant results were shown in 9 dogs, but were further tested by PCR-*Leishmania* sp with positive results. VL was also confirmed in 5 of them. PCR-*L. (L.) chagasi* also, showed high specificity detecting 61 dogs negative for VL. The 5 dogs with positive culture and PCR-*Leishmania* sp had New World cutaneous leishmaniasis (CL) since they were positive for PCR-*L. (V.) braziliensis*. The third step of this study evaluated the efficacy of PCR (PCR-*L. (V.) braziliensis*) in detecting *Leishmania* in patients with cutaneous lesions. The results were compared to those obtained by traditional methods of CL diagnosis (parasitological methods, Montenegro intradermal reaction and histopathological analyses) in 109 biopsies from patients with cutaneous lesions living in the Sorocaba, the second most endemic region of São Paulo State. Definitive diagnosis, established by clinical and “consensus laboratory criteria” (positive culture, stained tissue smears or PCR), determined 52

patients with CL and 57 with other etiologies. The sensitivity and specificity of PCR–*L. (V.) braziliensis* were 96% and 100%, respectively. The parasitological methods showed sensitivity of 69% and specificity of 100%. Montenegro intradermal tests were highly sensitive (100%) but with low specificity (65%). These false-positive results could be related to possible cross-reactions with other infections or allergenic response to phenol, the preservative present in the Montenegro reagent. This study confirmed the high sensitivity and specificity of PCR for differential diagnosis of leishmaniasis and showed the importance of including PCR for species identification.

Lista de abreviaturas e siglas

°C – Graus centígrados

AIDS – do inglês “ Acquired Immune Deficiency Syndrome”

BAB – do inglês “ Blood Agar Base ”

BSA – do inglês “ bovine serum albumin”

CCD – Centro de Controle de Doenças

Linfócitos T CD4+ - Linfócitos T (h) que expressam proteína CD4

CDC – do inglês “ Centers for Disease Control “

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica

D.O. - Densidade óptica

DRS-16 – Departamento Regional de Saúde - Sorocaba

DNA – do inglês “ desoxirribonucleico acid ”

dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatados

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra- acético

ELISA – do inglês “Enzyme-linked immunosorbent assay”

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde

g - Aceleração da gravidade

HIV – do inglês “Human Immunodeficiency vírus”

KDNA – DNA do cinetoplasto

NNN - Meio de Novy – Mcneal – Nicolle

pb – Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PUC – Sorocaba - Pontifícia Universidade Católica de Sorocaba

RFLP - Análise do polimorfismo do DNA por fragmentos de restrição enzimática.

RNase - Ribonuclease

SDS – Sódio Dodecil Sulfato

TBE – Tris/ Borato/ EDTA

Tris-HCl – tris/ ácido clorídrico

UV - Ultravioleta

WHO – do inglês “World Health Organization”

Lista de tabelas e figuras:

Quadro 1 - Principais agentes etiológicos, manifestações clínicas e distribuição geográfica das leishmanioses no Novo Mundo.	23
Quadro 2 - Marcadores utilizados neste estudo, condições de temperatura para cada par de marcadores e tamanho do produto amplificado.	51
Tabela 1 - Avaliação da sensibilidade da PCR e m diagnosticar LVA. Comparação dos métodos parasitológicos e da PCR – <i>L.(L.) chagasi</i> em cães sintomáticos (Grupo I) e assintomáticos (Grupo II).	58
Tabela 2 - Genotipagem das amostras positivas pelos métodos parasitológicos com diagnóstico da LVA e LTA nos cães sintomáticos (Grupo I) e assintomáticos (Grupo II).	59
Tabela 3 - Comparação dos métodos tradicionais com a PCR para detecção de <i>L. (V.) braziliensis</i> em pacientes com lesão cutânea.	63
Tabela 4 - Diagnóstico laboratorial da LTA: sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo.	64
Tabela 5 - Distribuição dos dados clínicos e epidemiológicos dos 109 pacientes com LTA com suspeita clínica de LTA.	65
Figura 1 - Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> - A: amastigota e B: promastigota	19
Figura 2 - Ciclo biológico de <i>Leishmania sp</i>	22
Figura 3 - A: Lesão ulcerosa na mão de paciente em área endêmica de Sorocaba. B: lesões úlcero-crostosas na face e mão de criança de Itu.	29
Figura 4 - A: Lesão com comprometimento do septo cartilaginoso. B: Hepato-esplenomegalia em um garoto brasileiro de 4 anos de idade com LVA.	31
Figura 5 - A: Cão com LTA apresentando lesões na orelha. B e C: Cães com LVA apresentando caquexia acentuada, alopecia com descamação eczematosa, lesões de pele e onicogribose.	35
Figura 6 - Diagrama esquemático da organização de cada minicírculo de <i>Leishmania</i> e a localização dos marcadores para <i>Leishmania sp</i> e <i>L.(L.) donovani</i> .	52

Figura 7- Diagrama esquemático gene RNA mini-exon (ou spliced leader -SL) de *Leishmania* e localização dos marcadores que identifica *L.(V.) braziliensis*. 52

Figura 8- Análise dos produtos amplificados por PCR. A: para *L. (L.) chagasi* e B: para *L. (V.) braziliensis*. 56

Índice

1. Introdução.....	19
1.1. Morfologia	19
1.2. Transmissão e ciclo biológico.....	20
1.3. Classificação e nomenclatura.....	22
1.3.1. Subgênero <i>Viannia</i>	24
1.3.1.1. Complexo <i>L. (V.) brasiliensis</i>	24
1.3.2. Subgênero <i>Leishmania</i>	25
1.3.2.1. Complexo <i>L. (L.) mexicana</i>	25
1.3.2.2. Complexo <i>L. (L.) donovani</i>	25
1.4. Epidemiologia das leishmanioses	26
1.5. Patogenia das leishmanioses em humanos.....	28
1.5.1. Leishmaniose tegumentar americana	28
1.5.2. Leishmaniose visceral americana	30
1.5.3. Co-infecção com o vírus HIV.....	32
1.6. Patogenia das leishmanioses em animais domésticos.....	32
1.7. Tratamento.....	35
1.8. Diagnóstico das leishmanioses	36
1.8.1. Diagnóstico laboratorial	37
1.8.1.1. Métodos parasitológicos.....	37
1.8.1.2. Métodos imunológicos.....	38
1.8.1.3. Métodos moleculares e caracterização de <i>Leishmania</i>	39
2. Objetivo geral.....	42
2.1. Objetivos específicos.....	42
3. Material e métodos.....	43
3.1. Parasitos	43

3.2	Amostras caninas.....	43
3.3.	Amostras clínicas de pacientes.....	45
3.4.	Diagnóstico tradicional.....	46
3.4.1.	Teste intradérmico de Montenegro (IDRM)	46
3.4.2.	Exame histopatológico	46
3.4.3.	Diagnóstico parasitológico	47
3.4.3.1.	Método direto - (microscopia).....	47
3.4.3.2.	Método indireto - (cultura).....	47
3.5.	Diagnostico molecular.....	48
3.5.1.	Extração de DNA.....	48
3.5.2.	Quantificação do DNA.....	48
3.5.3.	Padronização da reação e escolha dos marcadores	49
3.5.4.	PCR e eletroforese.....	53
3.6	Análise dos dados.....	54
4.	Resultados.....	55
4.1.	Escolha e especificidade dos marcadores.....	55
4.2.	Diagnóstico molecular da LVA em amostras caninas.....	56
4.3.	Diagnóstico molecular da LTA em amostras humanas.....	60
4.4.	Dados clínico-epidemiológicos dos pacientes	61
5.	Discussão.....	66
6.	Conclusões.....	76
7.	Referências bibliográficas.....	77
8.	Anexos	99

Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEPIAL).....	100
Anexo 2 - Aprovação da Comissão Técnica Científica (CTC) do Instituto Adolfo Lutz.....	101
Anexo 3 – Publicação – artigo científico “PCR identification of <i>Leishmania</i> in diagnosis and control of canine leishmaniasis"	102
Anexo 4 – Carta de aceite para publicação: <i>Leishmania</i> (V.) <i>braziliensis</i> : detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis	111

1. Introdução

As leishmanioses constituem um grupo de zoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Apresentam grande complexidade nas características biológicas e geram diferentes graus de especificidade e interação com seus hospedeiros. Representam um sério problema de saúde pública mundial. A doença pode acometer a pele, mucosas e vísceras do homem, de animais domésticos e silvestres em diferentes regiões do planeta (Grimaldi e Tesh, 1993).

1.1. Morfologia

Leishmania é um protozoário da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Possui dois estágios distintos em seu ciclo de vida. (1) amastigota, quando o parasito é intracelular, multiplica-se nos macrófagos dos hospedeiros mamíferos. Apresenta forma oval medindo de 2 a 5 μm de diâmetro, flagelo curto e interiorizado, núcleo arredondado e excêntrico (figura 1A). (2) Promastigota, quando se desenvolve no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado (flebotomíneos) e em meios de cultura. Possui forma alongada medindo de 10 a 15 μm de comprimento e 1,5 a 3,5 μm de largura (figura 1B) (Grimaldi e Tesh, 1993; Pearson et al., 2000; Rey et al., 2001).

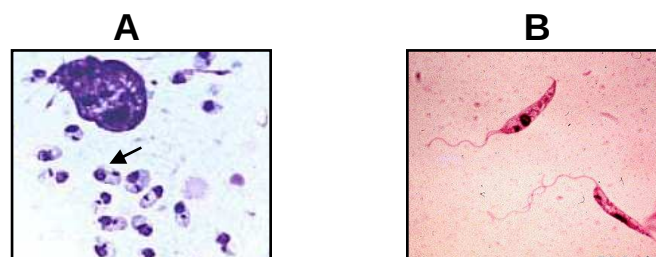


Figura 1. – Formas evolutivas de *Leishmania* - A: amastigota e B: promastigota. Fonte: www.who.int/tcdr

1.2. Transmissão e ciclo biológico

Os transmissores das leishmanioses são insetos da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae. São pequenos dípteros, pilosos e de cor-palha ou castanho-claro. Adotam a postura das asas abertas e ligeiramente levantadas, dando-lhes um aspecto peculiar, justificando seus nomes popularmente conhecidos no Nordeste brasileiro como “cangalhinha”, “orelha-de-veado”, “asa-dura”; no Sul como “mosquito-palha”, “birigui”; e na Amazônia, “tatuíra”. (Aguiar et al., 1986; Basano e Camargo, 2004).

Na América do Sul a leishmaniose tegumentar americana (LTA) causada pelas principais espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* tem como vetores as espécies *Lutzomyia migonei*, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. umbratilis* (Degraeve et al., 1994; Passos et al., 1999; Ashford, 2000). A leishmaniose visceral tem como transmissores cerca de 30 espécies de flebotomíneos no mundo (Desjeux, 1996). Nas Américas o principal vetor é *Lutzomyia longipalpis* (Laison & Shaw, 1987; Galati, 1997; Santos et al., 1998; Dos Santos et al., 2003).

Os protozoários são transmitidos dos hospedeiros invertebrados para hospedeiros vertebrados a partir da picada da fêmea do flebotomíneo infectada, que busca alimento (repasto sangüíneo) durante a maturação dos ovos. Ao picar o vertebrado, a fêmea regurgita as formas promastigotas metacíclicas infectantes do parasito que misturam-se à saliva (Figura 2). A saliva tem papel modulador da resposta imunológica do hospedeiro, facilitando o sucesso da infecção e a sobrevivência do parasito no sangue do hospedeiro vertebrado (Bogdan et al., 1990; Grimaldi e Tesh, 1993; Zer et al., 2001; Ramos-e-Silva e Jacques, 2002).

Nas Américas cerca de 40 mamíferos silvestres, geralmente roedores e marsupiais, já foram encontrados parasitados por *Leishmania*. Alguns considerados reservatórios naturais do parasito (Forattini et al., 1972; Falqueto e Sessa, 1991; Klaus et al., 1999; Brandão-Filho e Shaw, 2006).

Na pele do hospedeiro vertebrado os promastigotas são rapidamente fagocitados por macrófagos e no seu interior se transformam em amastigotas. Sofrem divisão binária formando grandes aglomerados, rompendo o macrófago, onde serão novamente fagocitados por outros macrófagos. Todas as espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos são parasitos intracelulares do sistema fagocítico mononuclear. No decurso das relações parasito-hospedeiro, seja no sentido da cura, seja nas diferentes manifestações clínicas, os fatores genéticos do parasito ou do hospedeiro terão seu papel fundamental na modulação das reações imunológicas (Bittencourt et al., 1996; Amato et al., 1998; Rittig e Bogdan, 2000).

A transmissão do parasito do hospedeiro vertebrado para o inseto se dá quando o inseto vetor pica o homem ou um animal parasitado. Retira juntamente com o sangue ou linfa intersticial as formas amastigotas. Dentro do tubo digestivo os parasitos passarão por formas variadas desde amastigotas típicas, esferomastigotas e por organismos piriformes ou fusiformes, até alcançarem a configuração promastigota que são ativas pelos movimentos flagelares. Os promastigotas se multiplicam por divisão binária, formando grandes aglomerados com aspecto de rosáceas, invadem as porções anteriores do estômago, proventrículo e esôfago do flebotomíneo (Figura 2) (Bogdan et al., 1990; Grimaldi e Tesh, 1993; Zer et al., 2001; Rey 2001; Ramos-Silva e Jacques, 2002).

Fatores ecológicos importantes refletem no processo sinantrópico que envolve o homem, animais e os insetos vetores. Entre esses pode-se

citar o grau de degradação ambiental, a disponibilidade de fonte contínua de alimentos, as adaptações que supostamente podem desenvolver esses parasitos e que podem traduzir mudanças na sua infectividade, patogenicidade e virulência, refletindo na forma clínica e na resposta terapêutica (Gomes, 1992).

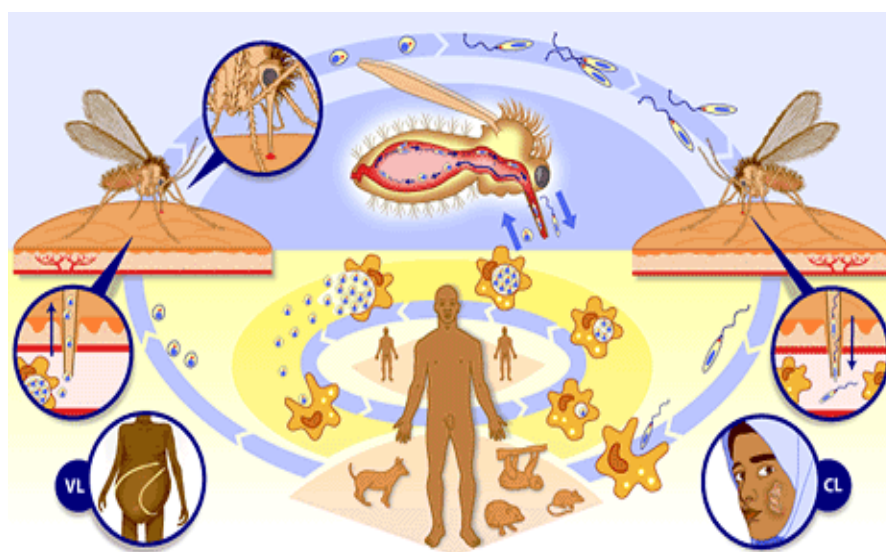


Figura 2. Ciclo biológico de *Leishmania* sp.
Fonte: www.who.int/tdr/disease/leish/lifecycle.htm.

1.3. Classificação e nomenclatura

A classificação e a nomenclatura das espécies de *Leishmania* distribuídas no Novo Mundo foram baseadas na distribuição geográfica e no tipo de lesões que causam ao homem (Quadro 1).

Outras espécies da América do Sul como *L. (V.) equatoriensis*, *L. (L.) hertigi*, *L. (L.) deanei*, *L. (L.) aristedes* e *L. (L.) forattinii* foram descritas até agora apenas em animais silvestres (Cupollilo et al., 1998).

Recentemente foi descrita uma nova espécie, a *L. (V.) lindenbergi* isolada de soldados por ocasião de um surto de leishmaniose no Estado do Pará, Brasil (Silveira et al., 2002).

Quadro 1: Principais agentes etiológicos, manifestações clínicas e distribuição geográfica das leishmanioses no Novo Mundo¹.

Espécie	Lesões causadas no homem	Distribuição geográfica
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	Cutâneas e mucosas	América Central e do Sul até o norte da Argentina
<i>L. (V.) peruviana</i>	Predominantemente cutâneas	Altos vales andinos e encosta ocidental dos Andes
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Predominantemente cutâneas	Noroeste e Norte da América do Sul até o rio Amazonas
<i>L. (V.) panamensis</i>	Predominantemente cutâneas	América Central e costa pacífica da América do Sul
<i>L. (V.) lainsoni</i>	Casos raros com lesões cutâneas	Norte do Estado do Pará
<i>L. (V.) shawi</i>	Casos raros com lesões cutâneas	Região Amazônica
<i>L. (V.) naiffi</i>	Casos raros com lesões cutâneas	Região Amazônica
<i>L. (V.) colombiensis</i>	Cutâneas e mucosas	Colômbia Panamá e Venezuela
<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	Cutâneas eventualmente mucosas difusas	México e América Central
<i>L. (L.) amazonensis</i>	Cutâneas eventualmente cutâneas difusas	América Central, Norte, Nordeste, Centro Oeste ² ; Sudeste ³ e Sul do Brasil.
<i>L. (L.) pifanoi</i>	Cutâneas eventualmente cutâneas difusas	Venezuela
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	Cutâneas	Venezuela
<i>L. (L.) garnhami</i>	Predominantemente cutâneas	Andes Venezuelanos
<i>L. (L.) infantum = L. (L.) chagasi</i>	Lesões viscerais (calazar)	Sul do México ao Norte da Argentina, com predominância no Nordeste Brasileiro.

¹Segundo Marzochi et al., 1999; ²Dorval et al, 2006; ³Taniguchi et al., 2005.

1.3.1. Subgênero *Viannia*

1.3.1.1. Complexo *L.(V.) braziliensis*

As espécies mais freqüentes que causam a leishmaniose tegumentar no Brasil são *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*. São responsáveis pela forma cutânea localizada, causando uma lesão na pele que pode-se curar espontaneamente após algumas semanas ou meses.

L. (V.) braziliensis pode desenvolver a forma mucocutânea que se inicia com úlcera primária de pele que pode desenvolver metástases na região oronasal, causando grande destruição de tecidos e, que em alguns casos, são extremamente mutilantes (Gontijo e Carvalho, 2003; Basano e Camargo, 2004; Pinheiro, 2004). Em geral cada espécie de *Leishmania* desencadeia manifestação clínica característica, entretanto é importante mencionar que diferentes espécies podem apresentar formas clínicas da doença de modo semelhantes, considerando fatores relacionados à resposta imune do hospedeiro.

L. (V.) guyanensis é mais freqüente nos Estados do Amazonas e Mato Grosso (Lainson e Shaw, 1987; Delgado et al., 1997; Romero et al., 2002). Diversas espécies do subgênero *Viannia* como *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) colombiensis* e *L. (V.) equatoriensis* foram isoladas de animais silvestres na Região Amazônica e países vizinhos, mas raramente infectam o homem (Passos et al., 1999; Andrade et al., 2001; Rey et al., 2001).

1.3.2. Subgênero *Leishmania*

1.3.2.1. Complexo *L. (L.) mexicana*

No Brasil a única espécie deste subgênero responsável por lesões cutâneas e mucosas é *L. (L.) amazonensis*. Produz lesões cutâneas únicas ou em pequeno número. Não produz metástases mucosas, mas pode causar a leishmaniose cutâneo-difusa ou forma disseminada da doença em indivíduos imunossuprimidos. As lesões causadas por *L. (L.) amazonensis* apresentam grande número de parasitos (Gomes, 1992; Pinheiro, 2004).

1.3.2.2. Complexo *L. (L.) donovani*

As espécies responsáveis pela leishmaniose visceral são: (i) *Leishmania (L.) donovani* encontrada em países da África Oriental e asiáticos, principalmente Índia, Paquistão e Bangladesh. Infecta preferencialmente indivíduos adultos, sendo conhecida como calazar indiano; (ii) *Leishmania (L.) infantum*, encontrada em áreas do Mediterrâneo, África Oriental, Oriente, Norte da Ásia e da China. Infecta preferencialmente crianças sendo conhecida como calazar infantil; (iii) *Leishmania (L.) chagasi*, responsável pela leishmaniose visceral das Américas (LVA) ou calazar americano. Infecta indistintamente adultos e crianças. O nome da espécie foi criado na suposição de tratar-se de espécie distinta e presente na região antes da colonização européia. Acredita-se agora que *Leishmania (L.) infantum* foi trazida da Região Mediterrânea por cães infectados que acompanhavam os imigrantes europeus. As pesquisas baseadas em análises enzimáticas e genéticas

revelaram que as diferenças entre as duas espécies são tão pequenas que não justificam diferenciá-las. Sendo assim, a maioria dos autores considera *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* a mesma espécie (Killick-Kendrik et al., 1980; Lopes et al., 1984; Lopes e Wirth, 1986; Lainson e Shaw, 1987; Marzochi e Marzochi, 1994; Maurício et. al., 1999 e 2006).

1.4. Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses constituem uma das sete prioridades da Organização Mundial de Saúde. Estimativas indicam que existem cerca de 400.000 novos casos anuais, 12 milhões de indivíduos estão infectados e 350 milhões de indivíduos estão expostos à doença (Desjeux, 1996; WHO, 2007).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é assinalada em quase todo o hemisfério ocidental do continente Americano, desde o México até o norte da República Argentina. A prevalência das leishmanioses no mundo é baseada em notificações e publicações de casos (WHO, 1990; Desjeux, 1996).

Nos últimos anos, o Brasil registrou uma média de 30 mil casos anuais no Rio de Janeiro, Bahia, Amazonas, Mato Grosso, Paraná e São Paulo. Embora novos casos da infecção devam ser notificados para os órgãos oficiais, muitas vezes a informação é negligenciada fazendo com que os dados oficiais sejam subestimados. As principais causas da subnotificação são: casos oligossintomáticos, desinformação de profissionais da importância da notificação e falta ou erro no diagnóstico. (Salman et al., 1999; Marzochi et al., 1999; Desjeux, 1996; FUNASA, 2002; Carvalho et al., 2006).

No Estado de São Paulo, a partir de 1907 a LTA surgiu de forma epidêmica entre os trabalhadores da construção da estrada de ferro

Noroeste do Brasil, na extensão das linhas da Companhia Paulista de Estradas de Ferro e da Estrada de Ferro Sorocabana. Atualmente o conceito clássico de transmissão está se modificando. Embora se mantenha a relação-proximidade da casa com a mata e a associação do homem invadindo o ambiente silvestre, a doença vem se manifestando em todas as faixas etárias e indistintamente entre sexos (Tolezano, 1994).

A leishmaniose visceral é uma das seis doenças endêmicas mais importantes do mundo, pela alta incidência e mortalidade principalmente entre crianças desnutridas e indivíduos imunocomprometidos como os pacientes com AIDS (Alencar et al., 1991). Tem distribuição geográfica mundial ocorrendo na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e Américas, com exceção do continente Oceania. Nas Américas, a leishmaniose visceral (LVA) tem ampla distribuição desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. É uma zoonose tendo o cão como um dos principais reservatórios no ambiente doméstico (Deane e Deane, 1964).

No Brasil já foi descrita em várias regiões rurais, periurbanas e urbanas de grandes centros como Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Corumbá (MS) entre outros. Atualmente é endêmica em 19 dos 27 estados brasileiros (Ministério da Saúde, 2007). Até 1998, no Estado de São Paulo a doença ocorria somente como casos esporádicos, cujas investigações posteriores revelaram tratar-se de “importados”. Em 1998, no município de Araçatuba, região oeste foi detectado o primeiro caso canino autóctone do Estado de São Paulo e a presença do vetor *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912; Galimberti et al., 1993; Tolezano et al., 1999). Em 1999 surgiu o primeiro caso humano autóctone nesta região (Savani et al., 1999; CVE/SES, 2007). Desde então, observa-se a expansão da doença à medida que se verifica a adaptação do vetor a

zonas urbanas (Camargo - Neves et al., 2001; Camargo - Neves e Gomes, 2002).

1.5. Patogenia das leishmanioses em humanos

Os diferentes grupos de *Leishmania* apresentam diferentes características quanto à infectividade e virulência. A patogenicidade varia de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida, as condições genéticas e os mecanismos de regulação imunológica do hospedeiro. Todas estas características contribuem para a diversidade dos quadros clínicos da doença como lesões discretas e localizadas evoluindo para cura ou para o desenvolvimento de metástases (Grimaldi e Tesh, 1993; Marzochi e Marzochi, 1994; Grevelink e Lerner, 1996; Silveira et al., 1998).

1.5.1. Leishmaniose tegumentar americana

A evolução da LTA depende da resposta do hospedeiro a partir do local da picada do vetor e a localização das lesões (Marzochi e Marzochi, 1994). As lesões começam como uma infecção localizada e evoluem para disseminada ou difusa, dependendo da espécie de *Leishmania* e das deficiências de resposta celular do hospedeiro (Grimaldi et al., 1987; 1989; Grimaldi e Tesh, 1993; Gontijo e Carvalho, 2003).

L. (V.) braziliensis é responsável por lesões cutâneas e mucosas, que podem recidivar após o tratamento e cura (Passos et al., 1999; Andrade et al., 2001).

As lesões são exclusivamente de pele e localizam-se preferencialmente nas partes descobertas do corpo e que são mais expostas às picadas dos flebotomíneos. Neste local observa-se destruição celular e reação inflamatória. A inflamação cutânea evolui para necrose formando úlceras arredondadas ou ovaladas de aspecto raso ou profundo. As bordas das lesões são salientes, endurecidas e com limites internos. São chamados de “talhados a pique” (Rey, 2001). Outras formas podem também surgir como impetigóide, liquenóide, tuberculosa, lupóide, nodular, vegetante, ectimatóide ou em crostas (Amim e Manisali, 2000; Gontijo e Carvalho, 2003). A ocorrência de linfadenopatia regional geralmente precede o surgimento das ulcerações por uma a doze semanas. Na maioria dos casos a infecção progride e, após um período de latência clínica que pode durar até vários meses, surgem lesões cutâneas e/ou mucosas devido à disseminação hematogênica e/ou linfática (Dowlati, 1996; Salman et al., 1999; Gontijo e Carvalho, 2003). As Figuras 3A e 3B mostram uma lesão ulcerosa e lesões úlcero-crostosas, respectivamente.

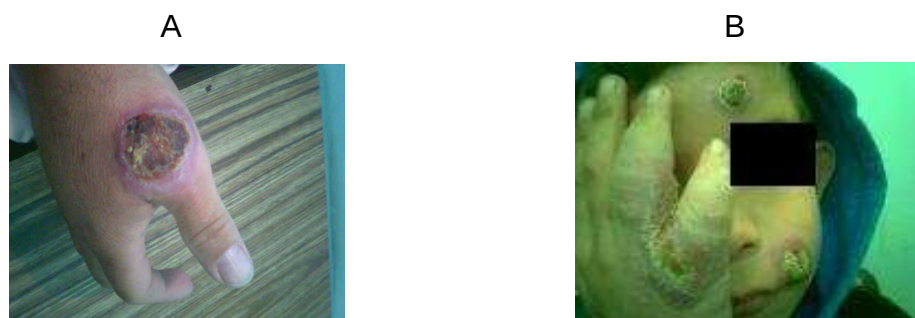


Figura 3. A: Lesão ulcerosa de uma paciente em área endêmica de Sorocaba, SP. B: Lesões úlcero-crostosas localizadas na face e entre os dedos da mão direita de uma criança em área endêmica de Itu, SP. Fonte: Documentário Instituto Adolfo Lutz - Sorocaba -SP.

A leishmaniose mucosa é a variação clínica mais prevalente na América do Sul. As manifestações incluem acometimento de pilares e úvula com aumento de volume, hiperemia, rugosidades e úlceras superficiais (Marsden, 1986). Caracteriza-se por nódulos sintomáticos mais freqüentes em membros inferiores com posterior ulceração e freqüentemente linfangite. Estima-se que 5% dos pacientes desenvolvam lesões secundárias no complexo naso-faríngeo como obstrução nasal, perfuração de septo e destruição da cartilagem nasal (Marsden, 1986; Schubach et al., 1998a; Marzochi et al., 1999; Amim e Manisali, 2000; Di Lella et al., 2006).

As lesões mucosas são clinicamente definidas pelo comprometimento do revestimento mucoso das vias aéreas superiores. Os mais comprometidos são: septo cartilaginoso, corneto nasais, palato mole, queda da pirâmide nasal, úvula, faringe e laringe. Nestes locais as lesões são ulcerosas, perfurantes, vegetantes ou necróticas (Figura 4A). Nas formas mais graves compromete a estrutura óssea da face ocasionando problemas na deglutição, fonação, respiração e alteração estética. Estes sintomas podem levar o paciente à morte (Marsden, 1986; Motta et al., 2007)

1.5.2. Leishmaniose visceral americana

Determinar a fase inicial da leishmaniose visceral é praticamente impossível devido à inexistência de sintomatologia clínica. No local da picada pode ocorrer uma lesão primária como uma pápula de cor pálida ou ligeiramente pigmentada, que pode desaparecer sem qualquer tratamento ou outra manifestação clínica. Gradualmente, quase imperceptivelmente e, dependendo da resposta imune do hospedeiro, alguns sintomas podem surgir. O período de incubação é muito variável, situando-se de 10 dias a

oito meses ou até três anos (Marsden, 1986; Amim e Manisali, 2000; Di Lella, 2006).

As formas clínicas podem variar como a assintomática, oligossintomática ou clássica. A forma assintomática caracteriza-se por não apresentar nenhuma manifestação clínica. É diagnosticada somente em inquéritos sorológicos em áreas de transmissão. A forma oligossintomática caracteriza-se pela presença de sinais ou sintomas como febre, hepatomegalia, diarreia e anemia discreta. Estes sintomas podem persistir por cerca de três a seis meses, podendo evoluir para a cura clínica espontânea ou para a doença plenamente que pode se manifestar num período de dois a 15 meses. A forma clássica caracteriza-se por manifestações clínicas exacerbadas como hepatoesplenomegalia, febre, comprometimento do estado geral, perda de peso progressiva, anorexia e astenia. As alterações dos exames laboratoriais mais significativas são anemia, leucopenia e/ou plaquetopenia e hipergamaglobulinemia. As complicações associadas à broncopneumonia, gastroenterites, septicemias e hemorragias contribuem para o aumento da mortalidade (Figura 4B).



Figura 4. A: Lesão com comprometimento do septo cartilaginoso. Fonte: Aula Prof. Valdir Sabbaga Amato. <http://www.cve.saude.sp.gov.br>. B: Hepato-esplenomegalia em um garoto brasileiro de 4 anos de idade com leishmaniose visceral. www.vet.uqa.edu/VPP/NSEP/Brazil2002/leishmania/Port/Leish09.htm

1.5.3. Co-infecção com o vírus HIV

A leishmaniose é considerada uma zoonose emergente e reemergente (Ashford, 2000) e a co-infecção de *Leishmania* sp e HIV ocorre em diversas partes do mundo. No sul da Europa, 2 a 9% dos pacientes com AIDS desenvolvem leishmaniose visceral, principalmente Itália apresentando alta prevalência (WHO/Leish/1996; Gradoni et al., 1996). No Brasil a co-infecção LTA mucocutânea e AIDS foi descrita pela primeira vez em 1987 em um paciente proveniente do Estado do Rio de Janeiro (Coura et al., 1987; Machado et al., 1992).

Na infecção por HIV observa-se progressiva desregulação do sistema imunológico, com desvio da resposta celular tipo Th1 para a humoral tipo Th2, o que é favorável para a replicação e disseminação de organismos intracelulares, como é o caso de *Leishmania* (Da Cruz et al., 2000; Sampaio et al., 2002; Ministério da Saúde-MVC-LVA - SP, 2007).

Nos pacientes com AIDS são descritas manifestações clínicas não usuais de casos de LVA por *L. (L.) chagasi* como lesões cutâneas, episódios de sinusite e pneumonia (Machado et al., 1992; Postigo et al., 1997; Rabello et al., 1998; Orsini et al., 2002). Nos casos de LTA cutâneo por *Leishmania (V.) braziliensis* os pacientes apresentam diversidade clínica, quadros graves, disseminação e refratariedade ao tratamento habitual (Górgola et al. 1993; Sampaio et al., 2002; Di Lella, 2006).

1.6. Patogenia das leishmanioses em animais domésticos

A patogenia e sintomatologia da forma cutânea da LTA nos animais domésticos são muito semelhantes às dos humanos. Os animais acometidos podem apresentar lesão única ou múltipla, podendo ser

ulceradas, vegetantes ou crostosas. As lesões surgem em regiões do corpo mais desprotegidas de pêlos. Nos cães, eqüinos e felinos, as lesões ocorrem nas pontas das orelhas, olhos, lábios, narinas, região anal e genitálias (Figura 5A) (Barros et al., 1985; Ramos-e-Silva e Jacques, 2002)

Como nos humanos, o estado imunológico do animal determina o processo patogênico da doença. Pode evoluir para cura espontânea ou desencadear quadros graves como lesões bucais, lesões abertas sujeitas a infecções secundárias por fungos e bactérias levando o animal à debilidade e morte.

A ocorrência de LTA em humanos e cães simultaneamente em áreas endêmicas sugere questionamentos sobre o papel do cão no ciclo de transmissão do parasito. Reithinger et al. (1999) sugeriram a investigação não só nos cães e outros animais domésticos, mas também nos vetores e animais silvestres que freqüentam o peridomicílio, bem como a persistência da infecção em cães e sua possível relação com a infecção.

Nas áreas urbanas pelo fato de não ter sido identificado claramente até o momento o principal reservatório, vários autores incriminam os cães como reservatório nas áreas peridomiciliares e domiciliares (Barros et al., 1985; Falqueto et al., 1986; Sessa et al., 1994). Outros autores acreditam que o “reservatório” configura-se no equilíbrio entre o hospedeiro e o parasito, fato que não ocorre no cão (Ashford, 1996). Portanto torna-se difícil afirmar que o cão desempenhe este papel, visto que o mesmo apresenta sintomatologia. Nas áreas endêmicas no Estado de São Paulo, seja área rural, periurbana ou urbana a transmissão ainda envolve os fatores clássicos primários como a presença da mata e/ou resíduo de mata, do inseto vetor, animais silvestres e o homem interagindo com os mesmos.

Estudos realizados por Savani et al. (1999) em cães errantes do Estado de São Paulo demonstraram que, mesmo em áreas de alto risco,

estes não apresentaram nenhuma relação com o ciclo de transmissão e seu papel é irrelevante como fonte de infecção.

Cães portadores de LVA apresentam lesões cutâneas, alopecia com descamação eczematosa, principalmente na região dos olhos, nas articulações e pregas da pele. As áreas sem pêlos favorecem o ataque do vetor e quando há lesões, estas são ricas em parasitos (Ashford et al., 1996). Os sinais clínicos clássicos na maioria dos casos sintomáticos é o crescimento exagerado das unhas (onicogrifose), lesões oculares (ceratoconjuntivite bilateral, uveíte e glaucoma), anorexia, febre irregular, apatia, polipnéia, palidez de mucosas, caquexia, linfadenopatia generalizada, leucopenia, hepatoesplenomegalia, rachaduras no coxim plantar, coriza, edema nas patas, neuralgia, poliartrite, polimiosite, lesões ósseas e hemorragias por trombocitopenia. Frequentemente a doença progride para a morte (Figuras 5B e 5C) (Deane e Deane, 1955; CVE-Inf. Técnico-LVA-SP, 2007). Assim como o homem, as três formas clínicas podem ser evidenciadas na LVA canina. Na forma sintomática, os animais apresentam os sinais clínicos clássicos citados acima, altos títulos de anticorpos para antígenos brutos como lisados de *Leishmania* sp ou antígenos específicos como o rK39. Na forma oligossintomática exibem sinais clínicos pouco característicos e baixos títulos de anticorpos. Podem evoluir para a cura ou desenvolver a doença, quase sempre após um longo período de incubação. Na forma assintomática não apresentam sinais clínicos, porém os exames sorológicos e parasitológicos são positivos (Berrahal et al., 1996; Chatterjee et al., 1999; CVE-Inf. Técnico-LVA-SP, 2007).

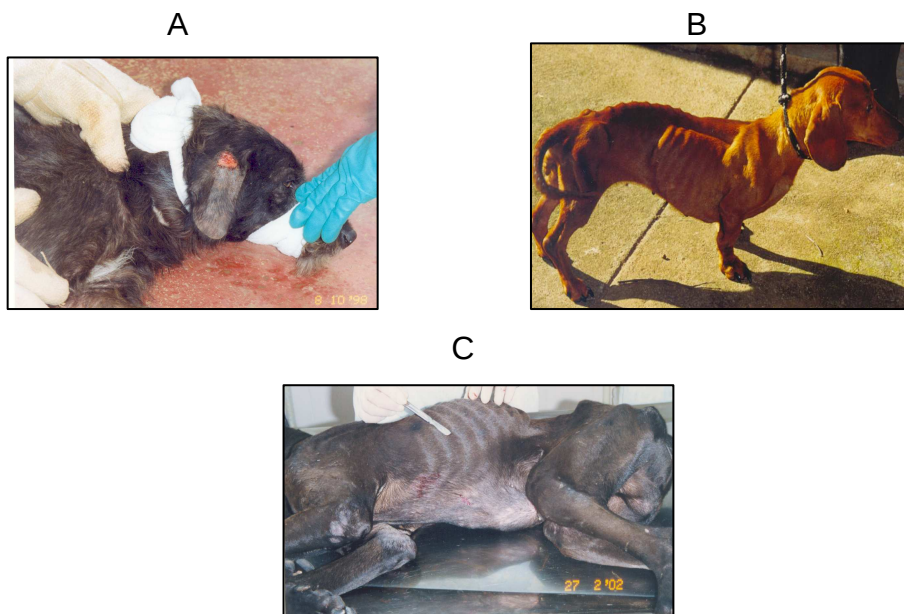


Figura 5. A: Cão com LTA apresentando lesão na orelha. B e C: Cães com LVA apresentando caquexia acentuada, alopecia com descamação eczematosa, lesões de pele e onicogribose. Fonte: Foto gentilmente cedida pelo Prof. Dr. José Eduardo Tolezano, Instituto Adolfo Lutz, SP.

1.7. Tratamento

O tratamento das formas cutâneas visa o controle clínico dos doentes evitando as recidivas e a evolução para a forma mucocutânea. Desta forma, previne-se o aparecimento de lesões mutilantes (Koff e Rosen, 1994; Marzochi et al., 1999; Da Cruz e Azeredo Coutinho, 2001).

Apesar da diversidade de espécies de *Leishmania* e da variedade de formas clínicas, do ponto de vista terapêutico, todas são submetidas aos mesmos medicamentos. No entanto, diferem quanto à sensibilidade aos quimioterápicos (Botelho et al., 1998; Machado et al., 2002). A droga de primeira escolha é o antimonial pentavalente *antimoniato de N-metil-glucamina*, comercialmente conhecido como Glucantime®. Não havendo resposta satisfatória, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B e anfotericina B lipossomal e a de terceira escolha é a pentamidina (Castro,

1972; Amato et al., 1996; Moskowitz e Kurban, 1999; WHO, 2007; Minodier et al. 2007).

O esquema terapêutico difere entre alguns Estados do Brasil, mas seguem a orientação da Organização Mundial da Saúde e do Ministério da Saúde (WHO, 2007). Pacientes em tratamento necessitam de avaliação clínica antes, durante e após o tratamento devido aos efeitos colaterais, cardiotoxicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos que os medicamentos desencadeiam (Marsden, 1986; Marzochi et al., 1999; Rodrigues et al., 1999; Ribeiro et al., 1999).

O tratamento de cães com leishmanioses (LTA e LVA) não apresentam bons resultados, porque mesmo que o cão melhore seu quadro clínico, o protozoário permanece no seu organismo com a possibilidade de induzir resistência dos parasitos às drogas empregadas, o que dificultaria ainda mais o tratamento em humanos. O cão continuaria sendo o reservatório e uma importante fonte de contaminação para os vetores. Além disso, é um tratamento caro e prolongado que exige do proprietário responsável um compromisso muito grande (APASFA, 2008; WHO, 2007).

1.8. Diagnóstico das leishmanioses

O diagnóstico é composto pelos achados clínicos, a história epidemiológica e os testes laboratoriais (Furtado, 1980; Gontijo e Carvalho, 2003). Contudo, como o diagnóstico laboratorial é pertinente ao tema desta tese, somente ele será relatado nesta Introdução.

1.8.1. Diagnóstico laboratorial

1.8.1.1. Métodos parasitológicos

A pesquisa direta ou análise microscópica demonstra a presença de amastigotas e pode ser realizada em diferentes amostras biológicas. Na leishmaniose tegumentar as amostras comumente são obtidas da lesão por escarificação, aspiração ou biópsia. Na leishmaniose visceral, por punções de medula óssea, linfonodos ou baço. Estes materiais são fixados em lâmina por “imprint” ou aposição e corados por Giemsa ou Leishman (Navin et al., 1990; Marzochi et al., 1999; Genaro, 2002).

O exame histopatológico revela a presença ou não de infiltrado inflamatório granulomatoso linfocitário e células parasitadas por amastigotas em amostras provenientes de biópsias (Magalhães, 1986; Mehregan e Mehregan, 1999; Safaei et al., 2002).

O isolamento de *Leishmania* pode ser realizado *in vitro*, a partir dos diferentes materiais biológicos semeados em meios de cultura específicos para *Leishmania* como NNN ou Ducrey. Pode também ser realizado *in vivo* por meio de inoculação em animais de laboratório (Marzochi et al., 1999).

Os métodos parasitológicos são considerados de excelência para o diagnóstico das leishmanioses, pois é o diagnóstico de certeza, devido à demonstração do parasito. Entretanto, alguns fatores devem ser considerados. Não são capazes de identificar a espécie na infecção, fator importante para definir a doença. No caso de lesões cutâneas, a probabilidade de encontrar o parasito é inversamente proporcional ao tempo da lesão. A sensibilidade dos métodos parasitológicos em infecções por *L. (V.) braziliensis* está em torno de 100% nos primeiros meses de evolução, 75% aos seis meses e 20% acima de 12 meses (Reed, 1996;

Marzochi et al., 1999; Salman et al., 1999). O isolamento dos parasitos por meio da cultura apresenta sensibilidade em torno de 20 a 40%, isto ocorre pela escassez dos parasitos nas amostras biológicas e o alto índice de contaminação (Rodrigues et al., 1994; Berman, 1997; Marzochi et al., 1999). Os exames histopatológicos apresentam sensibilidade em torno de 50%. Diferenciam o *resultado positivo*, onde o parasito é evidenciado, do *resultado sugestivo*, onde se descrevem apenas as alterações histopatológicas, características que não definem o diagnóstico (Mehregan e Mehregan, 1999; Pirmez et al., 1999; Raso e Genaro, 2000; Ramos-e-Silva e Jacques, 2002).

1.8.1.2. Métodos imunológicos

Várias reações imunológicas foram desenvolvidas para o diagnóstico das leishmanioses. As mais utilizadas são: reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), “western blot”, hemaglutinação direta, difusão em gel, radioimunoensaio, citometria de fluxo para detecção de anticorpos anti-*L. (V.) braziliensis* (Anthony et al., 1980; Kar, 1995; Gonçalves et al., 2002; Rocha et al., 2002). São testes relativamente sensíveis, porém pouco específicos pela presença de reações cruzadas com antígenos de outros tripanosomatídeos (Grimaldi et al., 1987; Grimaldi e Tesh, 1993; Kar, 1995). Os testes imunológicos são recomendados como complementação diagnóstica e controle de cura, mas também não são capazes de distinguir a espécie de *Leishmania* (CVE-Inf. Técnico-LVA-SP, 2007).

A reação intradérmica de Montenegro (IDRM) é um teste utilizado com relativa frequência para o diagnóstico da LTA. O teste consiste na injeção intradérmica de 0,1 a 0,2 mL de uma suspensão de promastigotas

para a indução da resposta de hipersensibilidade tardia. Após 48 a 72 horas, pacientes tanto infectados assintomáticos como sintomáticos podem apresentar uma pápula endurecida superior a 5 mm de diâmetro (Salman et al., 1999). A positividade do teste é de 97% em pacientes que têm ou tiveram a doença, o que limita seu valor diagnóstico para as regiões endêmicas (Kar, 1995; Deps, 1998; Machado et al., 2002). Contudo, pode ser negativo na fase precoce da infecção, em pacientes imunodeprimidos e nas leishmanioses difusa e visceral (Salman et al., 1999; Ramos-e-Silva e Jacques, 2002).

O teste cutâneo é preparado mais comumente com promastigotas íntegros suspensos em solução salina fenolada. Alguns pacientes apresentam alta sensibilidade ao fenol, ocorrendo no local da aplicação uma reação falso-positiva muito exacerbada de origem alérgica (Marzochi et al., 1999).

1.8.1.3. Métodos moleculares e caracterização de *Leishmania*

Além dos exames parasitológicos e dos ensaios imunológicos destacamos dois métodos de caracterização não moleculares, que são a determinação por anticorpos monoclonais (ou Sorodema) e o perfil eletroforético de enzimas (Rioux et al., 1990; Cupolillo et al., 1994; Grimaldi e McMahon-Pratt, 1996). A utilização de anticorpos monoclonais apresenta a limitação das reações cruzadas com outras espécies de filogenia similar. A identificação da espécie de *Leishmania* por eletroforese de isoenzimas é demorada, podendo ser determinada em 2 ou 3 meses devido à necessidade de se obter grandes quantidades de parasito e exigindo muita dedicação e experiência do profissional. (Grimaldi e Tesh, 1993; Degraeve et al., 1994; Schallig e Oskam, 2002).

Por outro lado, os métodos moleculares utilizados para a detecção e taxonomia das diferentes espécies de *Leishmania* têm grande importância, pois colaboram para o melhor entendimento dos estudos epidemiológicos, quimioterápicos, de vacinas, de controle de reservatórios e vetores (Degraive et al., 1994; Marzochi et al., 1999).

A cariotipagem é empregada para examinar a heterogeneidade das diferentes cepas de *Leishmania* sp. Embora tenha sido um método eficiente para distinguir as semelhanças e diferenças entre as moléculas de DNA, não é capaz de identificar a espécie do parasito (Tavares et al., 1992). Contudo, quando associada à hibridização com marcadores específicos é capaz de distinguir espécies (Tavares et al., 1992; Sotto et al., 1995). A hibridização foi largamente utilizada para localizar seqüências específicas de genes com o auxílio de sondas que se ligam a cromossomos previamente preparados. Estas sondas originalmente foram desenvolvidas com marcadores radioativos para serem visualizadas por autorradiografia. Devido à alta periculosidade de exposição aos marcadores radioativos, hoje são utilizados marcadores químicos de luminescência que se baseiam na detecção de sondas marcadas com haptenos e enzimas anti-haptenos conjugadas, assim como substratos químicos de luminescência (Wilson, 1995). Entretanto o uso de sondas de kDNA em técnicas de hibridização possui um baixo limite de detecção (100-1000 parasitos por amostra clínica), limitando sua utilização no diagnóstico da LTA devido às lesões serem pobres em parasitos (Degraive et al., 1994; Wilson, 1995).

A análise do polimorfismo do DNA por fragmentos de restrição enzimática (RFLP) tem sido utilizada com sucesso na análise do polimorfismo de DNA genômico de *Leishmania* para a caracterização e a identificação de espécies ou subgêneros (Macedo et al., 1992; Russel et al., 1999; Marfurt, 2003; Volpini et al., 2003). Comparada à caracterização de isoenzimas, a PCR-RFLP possui a vantagem de cobrir todo o genoma

do organismo estudado. Possui expressão co-dominante, isto é, em cada loco estudado é possível identificar genótipos hetero e homozigotos, gerando mais informações. O número de marcadores é praticamente ilimitado. A desvantagem é que a técnica não pode ser automatizada e envolve passos intensivos em mão de obra, requer pessoal técnico habilitado e a disponibilidade de um banco de sondas que pode demorar anos para ser construído.

Em 1982 Wirth e MacMahhon-Pratt demonstraram por hibridização que não existe reação cruzada entre as moléculas de kDNA dos complexos *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) mexicana*. Esta descoberta fez com que vários pesquisadores desenvolvessem oligonucleotídeos baseados nas moléculas dos minicírculos de kDNA. Existe um consenso entre os pesquisadores de que essas moléculas são bons marcadores moleculares, pois se apresentam em grande número no cinetoplasto (cerca de 10.000 cópias) e têm uma região conservada de pelo menos 120 pares de bases (Degraeve et al., 1994; Cruz e Tosi, 1996; Rodrigues, 2000).

De forma geral, vários grupos propuseram a utilização da PCR como um método sensível para a identificação de *Leishmania*. Dependendo do tipo de marcadores (oligonucleotídeos iniciadores), pode-se amplificar o DNA para gênero, (Schubach et al., 1998b), subgênero (De Bruijn e Barker, 1992) ou para determinada espécie de *Leishmania* (Belli et al., 1998). O método baseado na PCR é específico, sensível e rápido.

Nosso estudo propõe realizar o diagnóstico diferencial das leishmanioses visceral e tegumentar por PCR, empregando um método relativamente simples e rápido utilizando marcadores específicos.

2. Objetivo geral

Estabelecer o diagnóstico molecular para a detecção e a caracterização das espécies de *Leishmania* responsáveis pelas leishmanioses visceral e tegumentar no Estado de São Paulo.

2.1. Objetivos específicos

1- Padronizar a reação da polimerase em cadeia (PCR) e a extração de DNA de diferentes amostras biológicas.

2- Avaliar o diagnóstico molecular da LVA utilizando a PCR, possibilitando a identificação de *Leishmania (L.) chagasi* do complexo *Leishmania donovani* das outras espécies do sub-gênero *Leishmania*.

3- Avaliar o diagnóstico molecular da LTA, possibilitando identificar *Leishmania* do sub-gênero *Viannia*.

4- Determinar a sensibilidade e a especificidade da PCR comparadas às observadas nos métodos tradicionais de diagnóstico laboratorial de leishmanioses.

3. Materiais e métodos

3.1. Parasitos

Para determinar a especificidade e a sensibilidade da PCR foram utilizadas as seguintes cepas: *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD), *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1967/PH8), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/2903) e *Trypanosoma cruzi* (cepa Y). As cepas de *Leishmania* foram mantidas a 25°C em meio 199, suplementado com L-glutamina 292 mg/L, piruvato de sódio 110 mg/L, bicarbonato de sódio 2,2 g/L, hemina 0,02%, soro fetal bovino inativado 10% e gentamicina 200 µg/mL. Epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram mantidos a 28°C em meio LIT (liver infusion tryptose medium) contendo 10% soro fetal bovino inativado (Camargo, 1964). Na fase log da curva de crescimento, 10⁸ parasitos foram centrifugados e lavados duas vezes com tampão fosfato tamponado (PBS), pH 7.2, a 1000 g por 10 min. Os sedimentos contendo os parasitos foram utilizados para a extração de DNA. Para testar a especificidade da PCR foram adicionados aos controles DNA extraído de *Rickettsia rickettsi*, *Rickettsia canis* e *Ehrlichia canis* (gentilmente doados pela Profa. Dra. Solange Maria Gennari - FMVUSP).

3.2. Amostras caninas

O diagnóstico molecular da LVA foi realizado em 114 amostras de cães de 30 diferentes municípios do Estado de São Paulo endêmicos para

LTA e/ou LVA. Estas amostras foram selecionadas considerando-se os fatores de risco epidemiológico para LVA como a proximidade com outros cães já infectados, sinais e sintomas da doença. As amostras caninas foram divididas em dois grupos de acordo com a sintomatologia. O grupo I, constituído de 44 cães sintomáticos que apresentaram pelo menos quatro sinais clássicos de LVA como dermatite esfoliativa, úlcera ou nódulo cutâneo, linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, anorexia, febre, palidez de mucosa e outros. Dos cães sintomáticos, após eutanásia foram coletados fragmentos de baço, fígado e linfonodos, e enviados para o Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central - SP para confirmar o diagnóstico clínico. O Grupo II foi composto de 70 cães assintomáticos ou oligossintomáticos que poderiam ser sugestivos de LVA ou outras doenças caninas. Os sinais mais comuns foram nódulos e úlceras cutâneas, baixo peso ou crescimento das unhas, aumento do abdômen. As amostras analisadas deste grupo de animais foram aspirados de medula e/ou linfonodo, biópsias de lesões cutâneas. Todas as amostras analisadas foram coletadas por médicos veterinários dos “Centros de Controle de Zoonoses” dos municípios estudados. Foram coletadas em condições estéreis e imediatamente colocadas em tubos contendo 1-2 mL de NaCl 0,85% estéril com gentamicina 200 µg/mL, encaminhadas para o nosso laboratório dentro de 48 horas e imediatamente processadas. Cada amostra foi dividida em três alíquotas. Duas foram processadas para realizar os métodos parasitológicos (direto e indireto) e a terceira para a extração de DNA.

3.3. Amostras dos pacientes

No período de junho a novembro de 2005 foi realizado o diagnóstico laboratorial de 109 pacientes com suspeita clínica de LTA. Os pacientes foram atendidos na Rede Pública de Saúde de 22 municípios da região de Sorocaba e o material biológico encaminhado ao Instituto Adolfo Lutz, laboratório I de Sorocaba. O Instituto Adolfo Lutz é o laboratório de referência para o DRS - 16 para realizar o diagnóstico laboratorial das leishmanioses.

As amostras dos pacientes foram coletadas nas Unidades de Saúde dos municípios por profissionais especializados conforme a descrição. Após a administração do anestésico, as lesões foram previamente limpas com solução anti-séptica e, com auxílio de um “punch” dermatológico descartável foi retirado um fragmento da borda da lesão. A biópsia foi colocada em frasco contendo 2mL de NaCl 0,85% estéril, acrescida de 200 µg/mL de gentamicina e encaminhada ao laboratório no prazo de 48 horas onde foi processada. Cada amostra foi dividida em três ou quatro alíquotas (dependendo do tamanho do fragmento). Duas foram utilizadas para os métodos parasitológicos e a terceira foi para a extração do DNA. O exame histopatológico foi realizado somente em 71 amostras (quarta alíquota).

Todos os dados relacionados a este trabalho foram obtidos segundo a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (anexo 1) e Comissão Técnico Científica (anexo 2) do Instituto Adolfo Lutz.

3.4. Diagnóstico tradicional

3.4.1. Teste intradérmico de Montenegro (IDRM)

Os testes foram realizados no Instituto Adolfo Lutz de Sorocaba. Eles foram efetuados por meio de injeção intradérmica de 0,1 mL de antígeno de Montenegro na face anterior do antebraço dos pacientes. O antígeno de Montenegro é constituído de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* homogeneizados em solução fenolada (0,5 %) à concentração de 40 mg/mL de nitrogênio (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, PR). As leituras foram efetuadas 72 horas após as inoculações, pela observação de presença de pápula ou “halo de endureção”. O teste foi considerado positivo quando a endureção foi maior ou igual a 5 mm de diâmetro.

3.4.2. Exame histopatológico

Os exames histopatológicos foram realizados no Departamento de Patologia – PUC – Sorocaba. Os fragmentos foram embebidos em blocos de parafina, submetidos a cortes de 4 µm e fixados em lâminas. A seguir as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e observadas em microscópio óptico (aumento de 400X). O resultado foi positivo quando amastigotas foram visualizadas e sugestivo quando se observaram apenas alterações histopatológicas (Ministério Saúde do Brasil, 2007; WHO, 2007).

3.4.3. Diagnóstico parasitológico

3.4.3.1. Método direto - microscopia

Uma alíquota do material coletado (raspado de borda de lesão, aspirados de medula e/ou linfonodo) foi distendido sobre uma lâmina de vidro formando um esfregaço. Os fragmentos de biópsias foram colocados por aposição na lâmina. Após serem fixados com metanol foram corados por Giemsa e observados por microscopia óptica (aumento de 1000X) para identificação de amastigotas (WHO, 2007).

3.4.3.2. Método indireto - cultura

Os fragmentos das lesões e de órgãos necropsiados foram previamente macerados utilizando um pistilo de plástico estéril e semeados em dois diferentes meios de cultura. Um dos meios é constituído de “ágar potato infusion” com 30% de sangue de coelho desfibrinado (Ducrey) e outro de ágar base, pH 6.8, com 5 -15% de sangue de coelho desfibrinado (BAB). Ambos os meios foram suplementados com uma fase líquida contendo 2,0 mL de “Brain Heart Infusion” (BHI) e urina humana estéril a 5% com 200 µg/mL de gentamicina (Armstrong e Patterson, 1994). Os tubos foram incubados a 22° C por 10 a 15 dias. Foram examinadas semanalmente para a observação de promastigotas (Grimaldi e Tesh, 1993; WHO, 2007).

O diagnóstico parasitológico foi considerado positivo quando se detectaram parasitos por pelo menos um dos métodos.

Os exames parasitológicos humanos foram realizados no Instituto Adolfo Lutz de Sorocaba e os de cães no Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central.

3.5. Diagnóstico molecular

3.5.1. Extração de DNA

Os aspirados de medula e/ou linfonodo, biópsias de lesão e os fragmentos de vísceras foram macerados e dissolvidos em tampão de lise (Tris-HCl, 10 mM, pH 8.0; EDTA, 10 mM; SDS, 0,5%; N-laurilsarcozil, 0,01%; proteinase K, 100 µg/mL) e incubados em banho-Maria a 56°C até a lise completa das células. O período de incubação variou de acordo com a amostra. As substâncias solúveis, aspirados e culturas contendo *Leishmania* foram incubados de 30 a 120 minutos, já os fragmentos de pele, linfonodos e vísceras cerca de 5 a 12 horas.

O DNA foi extraído pelo protocolo de fenol/clorofórmio/isoamil e para precipitação do DNA foi utilizado o isopropanol. O DNA precipitado foi lavado com etanol a 70% por meio de centrifugação a 10.000 g durante 10 minutos e o sedimento foi dissolvido em água contendo 20 µg/mL de RNase (Sambrook et al., 1989; Gomes et al., 2007).

3.5.2. Quantificação do DNA

As amostras de DNA dos parasitos isolados foram diluídas 1: 200 em H₂O Mili Q estéril e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (HACH DR 4000U) no comprimento de onda 260 e 280 nm (luz ultravioleta). O grau de pureza das extrações foi determinado pela razão entre as leituras D.O. 260/ D.O. 280 que deveria apresentar valores entre 1,8 e 2,0. Amostras que apresentaram razão abaixo de 1,6 (presença de proteínas ou contaminantes) foram novamente processadas. A concentração de DNA foi determinada pelas leituras realizadas a 260 nm.

Segundo Sambrook et al. (1989) a absorbância igual a 1 equivale à concentração de 50µg/mL de DNA dupla fita.

O volume de DNA utilizado para cada reação variou de 1 µl a 5 µl (85 a 425 ng). Esta variação deve-se à amostra utilizada e da fonte onde o DNA foi extraído (DNA extraído dos parasitos isolados em meio de cultura ou dos fragmentos de tecido).

3.5.3. Padronização da reação e escolha dos marcadores

Foram adotadas medidas de controle em todas as etapas da reação, desde a extração do DNA das amostras, realização da PCR, funcionamento do termociclador, manipulação do produto amplificado, separação eletroforética, coloração e visualização dos fragmentos. Em todos os procedimentos, materiais e equipamentos utilizados nas diferentes etapas foram adequados às exigências quanto à desinfecção ou esterilidade e se encontravam em perfeitas condições de funcionamento.

Cada conjunto de reação foi acompanhado de dois controles negativos (água pura e DNA extraído de amostra sabidamente negativa para *Leishmania*) e um controle positivo (DNA extraído de promastigotas das cepas padrões de referência das diferentes espécies de *Leishmania*).

Para verificar a integridade do DNA extraído das amostras clínicas foram realizadas PCR utilizando o marcador $\beta 1$ - $\beta 2$ (5'ACCACCAACTTCATCCACGTTCCACC-3' e 5'CTTCTGACACAACGTGTGTTCACTAGC3') que amplifica um fragmento de 140 pb do gene da β -globulina humana (Lee et al., 2001). Este procedimento adicional permitiu verificar a presença de algum agente capaz de inibir a reação de amplificação. Se alguma substância inibidora da *Taq*-DNA polimerase estivesse presente na amostra devido a algum erro durante a

extração da mesma, o resultado seria negativo. Nestes casos, onde a reação de amplificação de uma amostra humana não ocorreu, procedeu-se à re-extração da mesma a partir da etapa do clorofórmio/isopropanol. As reações em que foi utilizado o marcador $\beta 1$ - $\beta 2$ foram realizadas simultaneamente, ou com o mesmo protocolo de temperatura das reações de um dos marcadores para *Leishmania*. Após a certeza de que todas as amostras clínicas não possuíam nenhum inibidor, realizou-se a PCR utilizando os marcadores específicos.

Os marcadores descritos no Quadro 2 foram testados com as espécies “padrão”. A adaptação da temperatura de anelamento dos marcadores foi realizada com reações em gradiente. Os tempos dos programas de temperatura também foram adaptados às condições de nosso termociclador. Somente os marcadores grifados apresentaram resultados favoráveis e foram escolhidos para desenvolver este trabalho.

Leishmania sp foi identificada utilizando-se um marcador que amplifica um fragmento de 120 pb da região conservada dos minicírculos do kDNA (Passos et al., 1999) (Quadro 2 e Figura 6).

L. (L.) chagasi foi identificada utilizando-se um marcador que amplifica um fragmento de 145 pb de uma região variável do minicírculo do kDNA (região LT1), específica para o complexo *L. (L.) donovani* (Ravel et al., 1995; Lê Fichoux et al., 1999) (Quadro 2 e Figura 6).

L. (V.) braziliensis foi determinada utilizando-se um marcador que amplifica um fragmento de 146-149 pb (Quadro 2). A sequência alvo de um dos iniciadores é da região conservada SL, comum em todas as espécies de *Leishmania*. O outro iniciador provém da região não transcrita, variável e específica para o complexo *L. (V.) braziliensis* (Harris et al., 1998) (Figura 7).

Quadro 2. Marcadores utilizados neste estudo. Condições de temperatura para cada marcador e tamanho do produto amplificado

Espécie de <i>Leishmania</i> e marcador	Seqüência * sense e ** antisense	Anelamento °C /n ^o ciclos	Fragmento (pb)	Referência
<i>Leishmania</i> sp.				
K13 A	* 5' GTCGGGGAGGGGCGTTCT 3'	58°C/30	120	Lachaud et al., 2002
K13 B	** 5' ATTTTACACCAACCCCCAGTT 3'			
<u><i>Leishmania</i> sp.</u>				
<u>150</u>	* 5' GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA 3'	55°C/30	120	Passos et al., 1999
<u>152</u>	**5'(C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC 3'			
<u><i>L. (L.) chagasi</i></u>	*. 5' CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 3'	60°C/30	145	Ravel et al., 1995
<u>RV1</u>	** 5' CCACCTGGCCTATTTTACACCA 3'			
<u>RV2</u>				
<u><i>Leishmania</i> sp. - LU-5^a</u>	* 5' TTTATTGGTATGCGAAACTTC 3'	58°C/35	218-240	Harris et al., 1998 (Multiplex)
<i>L. (L.) mexicana</i> - LM-3A	** 5' GCACCGCACCGG(A/G)CCAC 3'		146-149	
<u><i>L. (V.) braziliensis</i> - LB-3C</u>	** 5' CGTC/GCCGAACCCCGTGTC 3'		351-397	
<i>L. (L.) chagasi</i> - LC-3L	** 5' GCCCGCG(C/T)GTCACCACCAT 3'			

As seqüências grifadas foram escolhidas

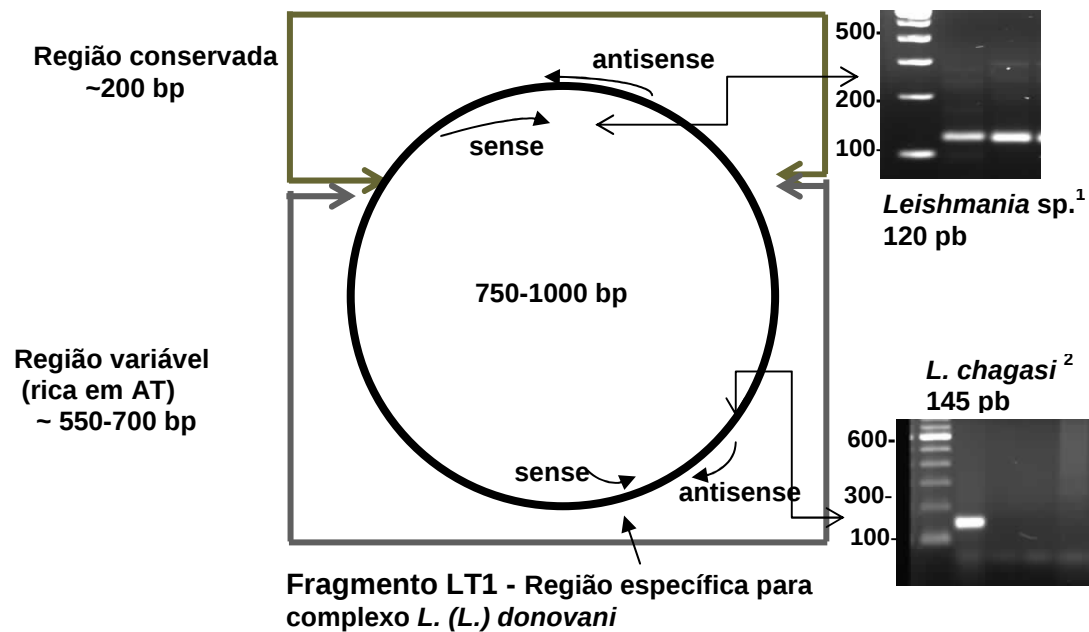


Figura 6. Diagrama esquemático da organização de cada minicírculo de *Leishmania* e a localização dos marcadores para *Leishmania* sp.¹ (Passos et al., 1999) e *L. (L.) donovani*² (Ravel et al., 1995).

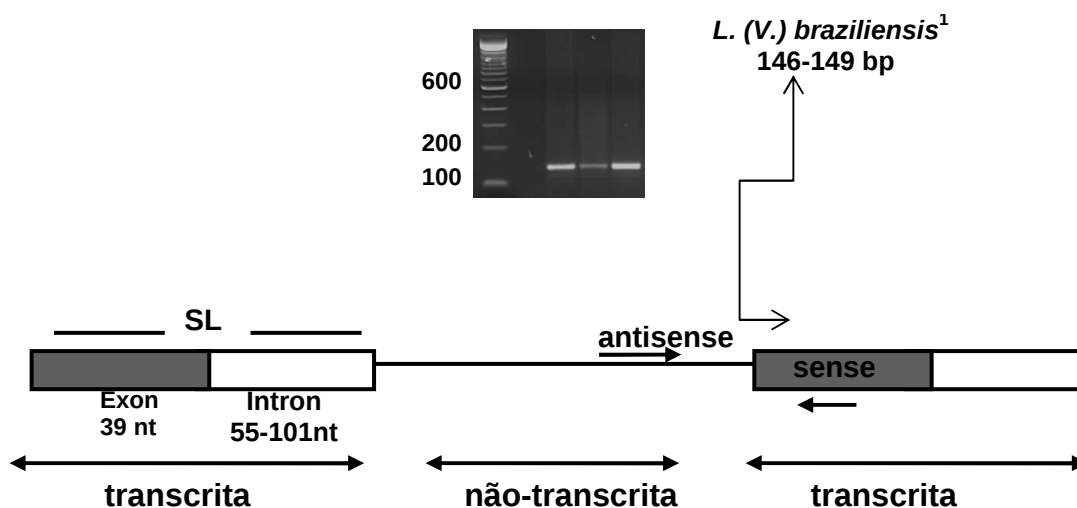


Figura 7. Diagrama esquemático do gene RNA mini-exon (ou spliced leader -SL) de *Leishmania* e localização do marcador que identifica o complexo *L.(V.) braziliensis*.¹ (Harris et al., 1998).

3.5.4. PCR e eletroforese

As amplificações foram realizadas com o “Kit” (Amersham–Pharmacia–Biotech). Cada tubo contém uma pérola que quando hidrolisada num volume final de 25µl é composta por 1,5 U de Taq DNA polimerase, Tris-HCl, 10 mM, pH 9.0; KCl, 50 mM; MgCl₂, 1,5 mM; 200 µM de cada dNTP e BSA com o estabilizante. Para cada reação foram adicionados à pérola, 50 pmoles de cada iniciador e 1µl a 5 µl de cada amostra de DNA, ajustando-se o volume final para 25 µl com água Milli Q livre de DNase.

Os tubos foram colocados no termociclador (LONG GENE – MG 96G). A primeira etapa foi composta de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos. A segunda etapa foi composta de ciclos de desnaturação a 94°C e extensão a 72°C por 30-60 segundos intercalados com ciclos de anelamento, cujo número e temperatura foram ajustados para cada par de iniciador e estão descritos na tabela 2. A terceira etapa foi de um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos amplificados foram diluídos em tampão de corrida (glicerol 30%; xilenocianol FF 0,25%; azul de bromofenol 0,25%) na proporção de 1:6, aplicados em gel de agarose a 2% em TBE (Tris-Borato, 0,045M; EDTA, 0,001M) com 0,5 µl/mL de brometo de etídio e separados por um sistema de eletroforese horizontal numa cuba contendo o mesmo tampão. Os géis foram visualizados sob iluminação com luz UV e as imagens captadas pelo programa Syngene GeneSnap Imager, versão 6.05.01. Os tamanhos dos fragmentos foram comparados com o padrão de peso molecular de 100 bp utilizado no gel juntamente com as amostras.

3.6. Análise dos dados

Os critérios clínicos e laboratoriais foram utilizados para estabelecer o diagnóstico definitivo da LTA. As amostras clínicas foram consideradas positivas quando os parasitos foram evidenciados por um dos métodos parasitológicos ou pela PCR positiva. Estes valores foram utilizados como “critério laboratorial”, onde cada resultado individual foi comparado para cálculo da sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN).

Os cálculos foram baseados em uma tabela 2x2 onde:

VP (verdadeiro positivo) = nº de indivíduos com a doença e com teste positivo.

FP (falso positivo) = nº de indivíduos sem a doença e com teste positivo.

VN (verdadeiro negativo) = nº de indivíduos sem a doença e com teste negativo.

FN (falso negativo) = nº total de indivíduos com a doença e com teste negativo.

Teste	Com doença	Sem doença
Positivo	VP	FP
Negativo	FN	VN

. As fórmulas estatísticas aplicadas foram:

1- Sensibilidade = $VP / VP + FN$;

2- Especificidade = $VN / VN + FP$;

3- Valor preditivo positivo = $VP / VP + FP$;

4- Valor preditivo negativo = $VN / VN + FP$.

As porcentagens de concordância foram calculadas pela relação:
nº de resultados concordantes / número total de amostras x 100.

4. Resultados

4.1. Escolha e especificidade dos marcadores

As padronizações dos marcadores mencionados na Tabela 2 foram realizadas utilizando-se DNA extraído das espécies “padrão” de *Leishmania*, que foram: *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD), *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1967/PH8) e *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/2903) por serem as três principais espécies causadoras das leishmanioses no Brasil. Incluímos também DNA extraído de *Trypanosoma cruzi*, o causador da doença de Chagas, por ser também classificado na ordem Kinetoplastida e por ser prevalente em algumas regiões onde também ocorre leishmaniose. Fontes de DNA extraídos de *Rickettsia rickettsi*, *Rickettsia canis* e *Ehrlichia canis* foram utilizados por causarem doenças em cães, cujos sintomas podem ser confundidos com leishmaniose.

As padronizações incluíram a adequação da reação às condições do nosso laboratório. Iniciamos com a adequação da temperatura de anelamento, pela reação em gradiente. Os tempos dos programas de temperatura também foram adequados às condições de nosso termociclador. O marcador RV1-RV2 foi o que apresentou melhores resultados para a determinação de *L. (L.) chagasi* (PCR-*L. (L.) chagasi*). Escolhemos o marcador 150-152, que foi o mais apropriado para detectar *Leishmania* sp. (PCR- *Leishmania* sp) e LU-5A-LB-3C, o mais apropriado para caracterizar *L. (V.) braziliensis* (PCR-*L. (V.) braziliensis*)

A especificidade dos marcadores RV1 - RV2 e LU-5A - LB-3C podem ser observadas na figura 8. O produto de 145 pb somente foi amplificado em *L. (L.) chagasi* (Figura 8 A). Da mesma forma, somente

L.(V.) braziliensis apresentou o fragmento de 145-149 pb amplificado quando foi utilizado o marcador LU-5A - LB-3C (Figura 8 B).

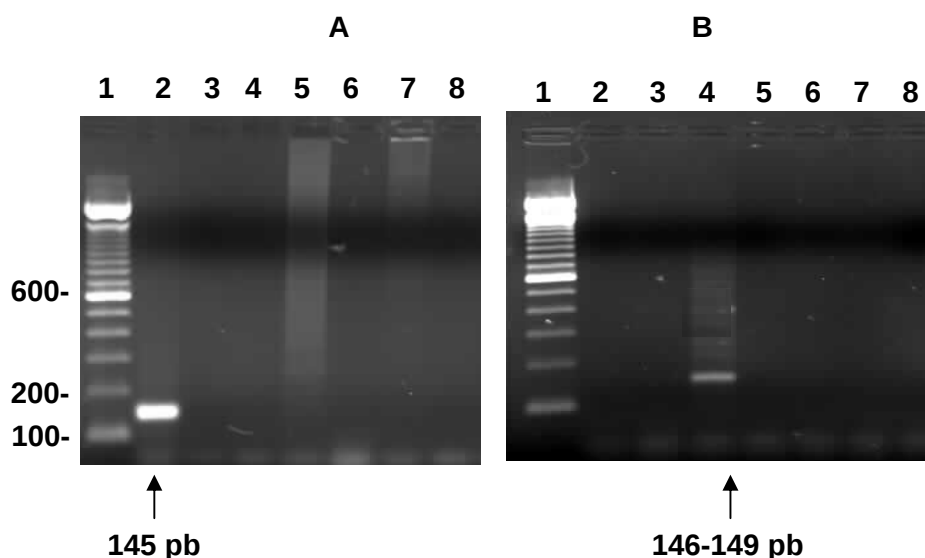


Figura 8 Análise dos produtos amplificados de *L. (L.) chagasi* (A) e *L. (V.) braziliensis* (B). *L. (L.) chagasi* foi identificada com dois marcadores que amplificam um produto de 145 pb de uma região específica (fragmento LT1) dos minicírculos de kDNA de *L. (L.) donovani*. *L. (V.) braziliensis* foi identificada com dois marcadores que amplificam um produto de 145-149 bp do gene SL-RNA. Um marcador provém da região conservada e o outro da região variável do gene e específica para o sub-gênero *Viannia*. As amostras de DNA indicadas na figura foram utilizadas na PCR à concentração de 85-90 ng. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em géis de agarose 2%. Linha 1, marcador de massa molecular (100 pb); linha 2, *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD); linha 3, *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1967/PH8); linha 4, *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/2903); linha 5, *Trypanosoma cruzi* (cepaY); linha 6, *R. rickettsi* (FMVUSP); linha 7, *Rickettsia canis* (FMVUSP); linha 8, *Ehrlichia canis* (FMVUSP).

4.2. Diagnóstico molecular da LVA em amostras caninas

As amostras biológicas dos 114 cães foram divididas em dois grupos segundo a sintomatologia: Grupo I, “sintomáticos”, composto de 44 cães sacrificados por apresentarem pelo menos quatro sinais clínicos clássicos de LVA. As amostras utilizadas para a extração de DNA foram fragmentos de necropsias de fígado, baço e linfonodo; Grupo II, “assintomáticos”,

constituído de 70 cães assintomáticos ou com leves sinais clínicos da LVA. As amostras utilizadas para a extração de DNA foram aspirado de linfonodo ou medula óssea e/ou biópsia cutânea.

A Tabela 1 mostra uma síntese dos resultados dos exames laboratoriais de ambos os grupos de cães. No Grupo dos 44 cães sintomáticos, 29 apresentaram resultados positivos e 13 negativos em ambas as metodologias, enquanto que 2 cães mostraram resultados discordantes (parasitos foram detectados pelos métodos parasitológicos, mas a PCR foi negativa). No Grupo dos 70 cães assintomáticos, 20 apresentaram resultados positivos e 43 negativos em ambas as metodologias e 7 cães apresentaram resultados discordantes (4 testes parasitológicos negativos e PCR-*L. (L.) chagasi* positiva e 3 cães com PCR negativa e cultura positiva). A porcentagem de concordância para ambas as metodologias foi de 92% para todas as amostras, sendo que no primeiro grupo foi de 95% e no segundo de 90 %

A seguir as amostras que apresentaram resultados discordantes foram investigadas. Todas foram ensaiadas para determinar se realmente eram infectadas por *Leishmania*. Todas as amostras foram positivas para a PCR-*Leishmania* sp, confirmando, assim, a presença da LVA em 4 cães do Grupo II que tiveram resultados negativos nos métodos parasitológicos e PCR-*L. (L.) chagasi* positiva (Tabela 2). Estes animais tiveram ambas as metodologias positivas após o sacrifício e fragmentos de órgãos analisados. Os outros 5 cães (2 do Grupo I e 3 do Grupo II) com resultados discordantes apresentaram cultura e PCR-*Leishmania* sp positivas. Como estes animais viviam em regiões que também são endêmicas para *L. (V.) braziliensis*, as amostras foram ensaiadas e apresentaram-se positivas na PCR-*L. (V.) braziliensis*. A Tabela 2 mostra a caracterização genotípica das amostras estudadas.

Tabela 1. Avaliação da sensibilidade da PCR em diagnosticar LVA. Comparação dos métodos parasitológicos e da PCR para *L.(L.) chagasi* em cães sintomáticos (Grupo I) e assintomáticos (Grupo II).

Cães	Tipo de amostra	Métodos Parasitológicos (Par.) e PCR- <i>L. (L.) chagasi</i>					
		Total	Concordantes			Discordantes	
			Resultados		concordância* (%)	Par. negativo PCR positivo	Par. positivo PCR negativo
			ambos positivo	negativo			
<i>Grupo I</i> “Sintomáticos” (sacrificados)	Fígado, baço, linfonodos (fragmentos/necropsia)	44	29	13	42 (95%)	0	2
<i>Grupo II</i> “Assintomáticos”	Aspirados de linfonodos, Biopsia cutânea	70	20	43	63 (90%)	4	3
Total		114	49	56	105 (92%)	4	5

*A porcentagem de concordância foi calculada pela relação: nº de resultados concordantes/ nº total de amostras x 100.

Tabela 2. Genotipagem das amostras positivas pelos métodos parasitológicos com diagnóstico da LVA e LTA nos cães sintomáticos (Grupo I) e assintomáticos (Grupo II).

Cães	Métodos Parasitológicos PCR- <i>Leishmania</i> sp. positivos	Identificação da espécie <i>de Leishmania</i>	
		PCR	
		<i>L. (L.) chagasi</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<i>Grupo I</i> "Sintomáticos" (sacrificados)	31	29	2
<i>Grupo II</i> "Assintomáticos"	27	24	3
Total	58	53	5

4.3. Diagnóstico molecular da LTA em amostras humanas

Todas as 109 amostras de pacientes com suspeita clínica de LTA foram analisadas por PCR-L. (*V.*) *braziliensis*. Para exclusão de casos de leishmaniose não causadas por *L. (V.) braziliensis* as amostras negativas foram ensaiadas na PCR-*Leishmania* sp. com o marcador 150-152. Simultaneamente também foram testadas com o marcador β 1- β 2 da globina humana. Este marcador amplifica um produto de 140 pb que quando positiva indica que a extração de DNA da amostra humana não apresenta inibidores da taq DNA polimerase. As amostras que apresentaram resultado negativo nesta PCR foram repurificadas e re-testadas.

O critério estabelecido para o diagnóstico definitivo foi um consenso entre os resultados obtidos nos métodos parasitológicos e na PCR-L.(*V.*) *braziliensis*.

Dos 109 pacientes com suspeita clínica de LTA, 52 (48%) foram positivos e 57 (52%) negativos. Conforme mostra a Tabela 3, dos 52 pacientes positivos para LTA, 50 (96%) apresentaram PCR-L. *braziliensis* positiva e, 36 (76%) testes parasitológicos positivos. A IDRM foi positiva nos 52 pacientes (100%). A medição do diâmetro da enduração (em milímetros) foi realizada 72 horas após a inoculação do antígeno de Montenegro. Este grupo de pacientes apresentou as seguintes medidas: 16 pacientes com enduração até 10 mm, 16 com 15 mm, 18 com 25 mm e 2 com 30 mm. O exame histopatológico foi realizado somente em 32 amostras, sendo 14 positivas, 14 sugestivas e 4 negativas. As duas amostras com PCR-L. *braziliensis* e PCR-*Leishmania* sp negativas foram positivas no exame direto . Dos 57 pacientes negativos todos tiveram resultados negativos na PCR-L. *braziliensis* e nos métodos parasitológicos. No entanto os 20 pacientes (35%) apresentaram resultados positivos na IDRM com as seguintes

medidas: 11 pacientes com enduração até 10 mm e 9 com 15 mm. O exame histopatológico foi realizado somente em 39 amostras e os resultados foram todos negativos. As 22 amostras discordantes (2 na PCR e exame direto e 20 na IDRM e PCR) foram ensaiadas com o marcador $\beta 1$ - $\beta 2$, Como todas apresentaram resultados positivos, foi comprovado que a extração de DNA foi perfeita e as amostras não apresentavam inibidores da taq DNA polimerase.

A tabela 4 mostra os resultados de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo dos métodos laboratoriais empregados no diagnostico da LTA. Para os métodos parasitológicos os valores foram: sensibilidade de 0.6923, especificidade de 1.0, VPP de 1.0 e VPN de 0,7808. A IDRM apresentou sensibilidade de 1.0, especificidade de 0.6491, valor preditivo positivo 0.7222 e valor preditivo negativo 1.0. Os exames histopatológicos foram excluídos da análise estatística devido ao número realizado ser inferior ao dos outros testes realizados.

4.4. Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes

A tabela 5 mostra a distribuição dos dados clínicos e epidemiológicos dos 109 pacientes estudados. Dos 52 pacientes com infecção por *L. (V.) braziliensis*, 36 (69%) eram do sexo masculino e 16 (31%) do sexo feminino. A distribuição da faixa etária foi de 8 (15%) menores de 15 anos, 14 (27%) de 15 a 34, 14 (27%) de 35 a 54, 9 (17%) de 55 a 64 e 7 (14%) maiores de 65 anos. Quanto ao local da residência, 11 (21%) foram de zona urbana, 15 (29%), de periurbana e 26 (50%), de zona rural, (Tabela 5). Os pacientes no momento da realização do diagnóstico apresentaram os seguintes tempos de lesão: 48 (1 a 6 meses) e 4 (7 a 12 meses). Lesões múltiplas foram observadas em 12 (23%) dos pacientes. As

lesões tanto múltiplas como únicas apresentaram as seguintes localizações: 16 (31%) nos membros inferiores, 19 (36%) nos membros superiores, 3 (6%) no tórax e 2 (4%) na cabeça.

Dos 57 pacientes sem LTA, 32 (56%) eram do sexo masculino e 25 (44%) do sexo feminino. A distribuição da faixa etária foi de 8 (14%) menores de 15 anos, 13 (23%) de 15 a 34, 18 (32%) de 35 a 54, 10 (17%) de 55 a 64 e 8 (14%) maiores de 65 anos. Quanto ao local da residência, 21 (37%) eram de zona de urbana, 14 (25%) de periurbana e 22 (38%) de zona rural. Os pacientes no momento da realização do diagnóstico apresentaram os seguintes tempos de lesão: 37 (1 a 6 meses), 16 (7 a 12 meses) e 4 (7%) mais de doze meses. Lesões múltiplas foram observadas em 3 (5%) dos pacientes. As lesões tanto múltiplas como únicas apresentaram as seguintes localizações: 35 (62%) nos membros inferiores, 8 (14%) nos membros superiores, 3 (5%) no tórax e 8 (14%) na cabeça.

Tabela 3. Comparação dos métodos tradicionais com a PCR para a detecção de *L. (V.) braziliensis* em pacientes com lesão cutânea.

Número de pacientes	Métodos Tradicionais										
	PCR		Parasitológico		Reação Intradérmica de Montenegro			Histopatológico			
	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	[10 - 15 - 25 - 30] (diâmetro em mm)	Neg	Pos	Sugestivo	Nr
Positivo 52	2	50	16	36	0	52	[16 – 16 - 18 - 2]	4	14	14	20
Negativo 57	57	0	57	0	37	20	[11 - 09 - 0 - 0]	39	0	0	18
Total 109	59	50	73	36	37	72		43	14	14	38

Neg: negativo, Pos: positivo e Nr: teste não realizado. O diagnóstico da leishmaniose tegumentar foi determinado segundo critério baseado no consenso laboratorial e descrito em Materiais e Métodos.

Tabela 4. Diagnóstico laboratorial da leishmaniose tegumentar: sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo.

Método	Número de amostras		Sensibilidade	Especificidade	VPP ^a	VPN ^b
	Negativo	Positivo				
PCR	59	50	0.9615	1.0	1.0	0.9661
Parasitológico	73	36	0.6923	1.0	1.0	0.7808
Reação Intradérmica de Montenegro	37	72	1.0	0.6491	0.7222	1.0

^a Valor preditivo positivo (VPP), ^b Valor preditivo negativo (VPN), a sensibilidade e especificidade determinados para cada ensaio considerando o critério de consenso laboratorial descrito em Materiais e Métodos

Tabela 5. Distribuição dos dados clínicos e epidemiológicos dos 109 pacientes com suspeita clínica de LTA.

Dados clínicos e epidemiológicos		Positivo (%) <i>n</i> =52		Negativo (%) <i>n</i> =57	
Sexo	<i>Masculino</i>	36	(69)	32	(56)
	<i>Feminino</i>	16	(31)	25	(44)
Idade (anos)	<i>≤ 15</i>	8	(15)	8	(14)
	<i>15-34</i>	14	(27)	13	(23)
	<i>35-54</i>	14	(27)	18	(32)
	<i>55-64</i>	9	(17)	10	(17)
	<i>≥ 65</i>	7	(14)	8	(14)
Habitação	<i>Urbana</i>	11	(21)	21	(37)
	<i>Periurbana</i>	15	(29)	14	(25)
	<i>Rural</i>	26	(50)	22	(38)
Tempo de lesão (em meses)	<i>1-6</i>	48	(92)	37	(65)
	<i>7-12</i>	4	(8)	16	(28)
	<i>≥12</i>	0		4	(7)
Lesões (local)	Pernas/pés	16	(31)	35	(62)
	Braços/mãos	19	(36)	8	(14)
	Tórax	3	(6)	3	(5)
	Cabeça	2	(4)	8	(14)
	Múltiplas*	12	(23)	3	(5)

* Lesões em dois ou mais locais.

Discussão

A idéia de conduzir este estudo surgiu devido à incidência da LTA e da LVA ter aumentado nos últimos 20 anos no Brasil. Cerca de 35 mil novos casos de LTA e 5.000 de LVA são notificados anualmente, praticamente em todos os Estados do Brasil (CVE, 2007). No Estado de São Paulo, apesar da LTA já estar instalada há mais de cem anos, a transmissão ainda ocorre durante as atividades realizadas no campo ou em regiões periurbanas. Esses fatores aliam-se ao grau de degradação ambiental imposto pelo crescimento das cidades (Rey, 2001). Quanto à LVA, o Estado de São Paulo apresenta uma baixa endemicidade quando comparada com outras regiões brasileiras. No entanto, desde os primeiros casos humanos notificados a partir de 1999 na cidade de Araçatuba, a doença está em franca expansão. Atualmente, o parasito já foi detectado em 55 municípios paulistas e os índices de mortalidade estão em torno de 10% (CVE, 2007). O Ministério da Saúde implantou programas de controle das leishmanioses nos diferentes Estados da Federação que visam um conjunto de ações como vigilância aos reservatórios, aos vetores e a população em geral. Uma das medidas adotadas para reduzir a incidência de LVA em humanos e em cães é eliminar cães infectados. Tal estratégia tem sido questionada, visto que a incidência da doença não diminuiu com o sacrifício dos animais. Várias razões justificam a falha das medidas de controle. Entre elas destacam-se o aumento da população canina, a demora entre a coleta do sangue do cão e a execução do exame (Reithinger et al., 1999; Costa et al., 2007), os exames laboratoriais utilizados no diagnóstico apresentam baixa sensibilidade e não diferenciam as diferentes espécies de *Leishmania*. Esses fatores interferem diretamente nas ações de vigilância e controle (Reithinger et al., 1999; Capelli et al., 2004).

Estas razões foram suficientes para buscarmos outros métodos de diagnóstico que pudessem apresentar maior sensibilidade e especificidade, de rápida e fácil execução. O objetivo deste estudo foi o de padronizar uma metodologia molecular eficiente, rápida e simples para diferenciar *L. (L.) chagasi* de *L. (V.) braziliensis* em amostras biológicas, visto que ambas as espécies são prevalentes no Estado de São Paulo. Outros métodos como a hibridização, caracterização bioquímica e RFLP também apresentam alta sensibilidade e especificidade, mas necessitam de maior tempo para a realização e também apresentam alto custo (Lopes et al., 1984; Rodriguez et al., 1994; Fernandes et al., 1996; Pirmez et al., 1999; Michalsky et al., 2002; Volpini et al., 2004). Para maior compreensão dos dados, este trabalho foi dividido em três partes.

A primeira parte deste trabalho restringiu-se à escolha e avaliação de marcadores específicos e à padronização da reação.

A escolha da região alvo para o desenho de iniciadores é de crucial importância, pois é um dos principais fatores para se estabelecer a alta sensibilidade e especificidade da reação. Neste estudo, três condições foram cuidadosamente avaliadas durante a escolha da região alvo: (i) elevado número de cópias; (ii) seqüências conservadas nas diferentes espécies de *Leishmania*; (iii) seqüências variáveis nas quais pudessem diferir, no mínimo, complexos.

Quando o objeto de estudo envolve protozoários da ordem Kinetoplastida como os gêneros *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Crithidia* e outros membros, além do DNA nuclear, conta-se com mais uma organela ricamente composta de DNA. O cinetoplasto, situado na base do flagelo é composto de uma rede de moléculas de DNA circulares (kDNA) que pode ser dividida em dois grupos. O primeiro grupo é composto de moléculas grandes, com cerca de 20-35 kb denominadas de maxicírculos. São

extremamente homogêneas entre os diferentes grupos que compõem a Ordem Kinetoplastida e estão presentes em cerca de 20-50 cópias/cinetoplasto. O outro grupo é composto de moléculas menores (de 0,5-1,5 kb) denominadas minicírculos. Apresentam-se em grande quantidade (10.000 unidades/cinetoplasto) e com seqüências heterogêneas entre os grupos. Desta maneira, os minicírculos são amplamente utilizados para separar classes, gêneros ou espécies.

Cada minicírculo de *Leishmania* é composto de uma molécula de DNA circular de 0,75 a 1kb de comprimento. Apresenta uma região de aproximadamente 200 pb contendo três blocos de seqüências conservadas em todas as espécies de *Leishmania* (Fu e Kolesnikov, 1994). O restante da molécula, aproximadamente, 550-700 pb apresenta seqüências altamente variáveis, contendo um grande número de nucleotídeos A e T. Nesta região existem as seqüências específicas para os diferentes grupos de *Leishmania* (Figura 6).

Outra região gênica vastamente utilizada como alvo para caracterizar espécies de *Leishmania* é o gene RNA mini-exon (ou “spliced leader”- SL) que se localiza no núcleo (Figura 7). Cada genoma apresenta cerca 100 a 200 cópias desse gene e cada uma delas, denominada SL é composta de uma região de transcrição conservada (exon) contendo uma seqüência de 39 pb e outra região (intron), também conservada, mas de tamanho variável (55 a 101 pb, dependendo da espécie). Entre cada SL existem as regiões variáveis que não são transcritas e diferem na seqüência de nucleotídeos e no tamanho (140 a 350 bp) (Harris et al.,1998).

Para validar uma PCR e utilizá-la no diagnóstico molecular da LVA canina e humana foram testados dois marcadores como descritos na tabela 2. O trabalho inicial foi o de adequar a reação às condições do nosso laboratório. Iniciamos com a adequação da temperatura de anelamento, pela da reação em gradiente. Os tempos dos programas de temperatura também

foram adequados às condições de nosso termociclador. O marcador RV1-RV2 (Ravel et al., 1995) foi o que apresentou melhores resultados. Este marcador foi construído a partir da região variável dos minicírculos do kDNA, específica para o complexo *L. (L.) donovani*, que engloba as espécies *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) archibaldi*.

A seguir, decidimos escolher um segundo marcador que identificasse somente gênero (*Leishmania* sp). Uma amostra com PCR- *L. (L.) chagasi* negativa poderia ser positiva para outras espécies de *Leishmania*. Assim, testamos dois marcadores, descritos no Quadro 2 nas mesmas condições experimentais que descritas acima para o marcador RV1-RV2. Escolhemos o marcador 150-152 (Passos et al., 1999), que amplifica uma seqüência de 120 pb da região conservada dos minicírculos de *Leishmania* (Fu e Kolesnikov, 1994).

A necessidade da escolha do marcador para *L. (V.) braziliensis* baseou-se nos resultados positivos para *Leishmania* sp. e negativos para *L. (L.) chagasi*. Escolhemos o marcador LU-5A - LB-3C, previamente descrito por Harris et al. (1998), que amplifica uma seqüência de 146 a 149 pb. A seqüência alvo de um dos iniciadores é da região conservada. O outro iniciador provém da região não transcrita, específica para o complexo *L. (V.) braziliensis* (Figura 7).

A segunda parte deste estudo foi a avaliação da PCR-*L. (L.) chagasi* em amostras caninas em um estudo prospectivo. A sensibilidade e especificidade da reação foram determinadas tendo-se como “padrão ouro” os métodos parasitológicos (microscopia direta e cultura *in vitro*). Nossos resultados demonstraram que houve 92% de concordância entre os métodos parasitológicos e a PCR. O marcador RV1-RV2 foi sensível em detectar *L. (L.) chagasi* tanto nas espécies “padrão” quanto nas amostras biológicas de cães. Das 53 amostras positivas na PCR, somente em 49 delas os parasitos

foram revelados pelos métodos parasitológicos. Resultados similares foram obtidos no diagnóstico de LVA em cães do sul da França (Lachaud et al., 2002). A especificidade também foi alta, pois não foram observadas reações positivas para outras espécies de *Leishmania*. Amostras de 61 cães foram negativas, ao passo que os métodos parasitológicos revelaram resultados positivos em 5 destas amostras. Estes resultados discordantes (negativos para *L. (L.) chagasi* e positivos para *Leishmania* sp e métodos parasitológicos) revelaram que estes animais poderiam estar infectados por outra espécie de *Leishmania*. A PCR-L. (V.) *braziliensis* positiva confirmou a suspeita que estes cães estavam com LTA, visto que estes animais viviam em regiões que também são endêmicas para LTA.

No Estado de São Paulo a LVA está em franca expansão, portanto novos focos vão sendo apontados à medida que novos casos caninos são confirmados. Das amostras estudadas, nem todos os cães com LVA eram de área endêmica. As investigações realizadas pelo Programa de Vigilância e Controle da LVA do Estado de São Paulo apontaram que alguns deles representavam casos autóctones. Desta forma, a PCR auxiliou o Programa para confirmar a ocorrência de 14 novos focos de LVA-canina nos 30 municípios investigados. Algumas destas regiões são endêmicas para LTA e cinco cães apresentaram PCR positiva para *L. (V.) braziliensis*, apesar dos cães apresentarem sintomatologia que levava à suspeita de LVA. Esses municípios foram reclassificados, segundo o Programa de LVA, como “municípios com transmissão” sendo investigados com estratégias específicas estabelecidas pelo Programa.

A terceira parte do estudo foi a avaliação da PCR-L. (V.) *braziliensis* para validar o diagnóstico molecular da LTA em lesões humanas utilizando um marcador espécie-específico. As amostras analisadas foram coletadas de pacientes atendidos em ambulatórios de Dermatologia da Rede

Pública de Saúde da região de Sorocaba, que é composta por 48 municípios de pequeno a grande porte. A escolha da região de Sorocaba deve-se à alta prevalência da LTA, sendo a segunda de maior endemicidade no Estado de São Paulo. Cerca de 80 casos são registrados por ano tanto em áreas rurais quanto urbanas. A prevenção de novos casos relaciona-se às estratégias de vigilância epidemiológica, incluindo o diagnóstico e tratamento adequados e o combate ao vetor (Desjeux, 1996; Marzochi et al., 1999; Salman et al., 1999; FUNASA, 2002; CVE, 2007).

Normalmente o diagnóstico da LTA é baseado nos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. As manifestações clínicas por sua vez podem estar associadas a determinadas espécies de *Leishmania*, mas sabe-se da existência de formas atípicas, disseminadas ou visceralizadas causadas por *L. (V.) braziliensis* (Gontijo e Carvalho, 2003; Basano, 2004; Pinheiro, 2004; Posada-Vergara et al., 2005). Atenta-se também para a importância do diagnóstico diferencial, uma vez que a LTA pode ser confundida com outras infecções que ocorrem com frequência em diferentes regiões do Brasil, como lesões por hanseníase, sífilis, tuberculose, blastomicose ou mesmo o carcinoma (Ramos-e-Silva e Jacques, 2002). Assim, é providencial e necessário confirmar os casos suspeitos e verificar a espécie de *Leishmania* envolvida, visto que os métodos tradicionais de diagnóstico não permitem a identificação, além da baixa sensibilidade. Assim, adotou-se como “padrão ouro” um consenso de resultados obtidos pelos métodos tradicionais e a PCR. O diagnóstico definitivo da LTA foi baseado na análise clínica e na evidência do parasito por um dos métodos parasitológico e/ou PCR. Dessa forma, das 109 amostras clínicas estudadas, 52 foram consideradas positivas e 57 negativas.

A sensibilidade e a especificidade da PCR-*L. (V.) braziliensis* foram de 96% e 100% respectivamente. Resultados similares foram obtidos em outros estudos (De Bruijn e Barker, 1992; Belli et al., 1998; Marques et

al., 2001; Barros et al., 2005; Oliveira et al., 2005; Venazzi et al., 2006; Fagundes et al., 2007; Gomes et al., 2007).

Somente dois pacientes apresentaram análise parasitológica positiva e PCR negativa. A hipótese de ter ocorrido problemas na extração de DNA e as amostras apresentarem inibidores da Taq DNA polimerase foi descartada pelo resultado positivo da PCR com o marcador $\beta 1$ - $\beta 2$ (que amplifica uma sequência humana). A hipótese das amostras estarem infectadas com outras espécies de *Leishmania* sp também foi eliminada pelo resultado negativo da PCR-*Leishmania* sp. Como estas duas amostras foram positivas somente no exame direto, não descartamos a idéia de um resultado falso positivo pela dificuldade de se identificar amastigotas em lesões extremamente infectadas com outros agentes. Estas observações são baseadas nos índices de sensibilidade e especificidade dos métodos parasitológicos obtidos neste estudo. A alta especificidade (100%) e a relativa sensibilidade (69%) podem ser relacionadas a fatores que interferem nessas análises, como as características da própria amostra clínica (biópsias e raspados), que comumente apresentam contaminação bacteriana, impedindo seu crescimento “in vitro” e/ou prejudicando a leitura microscópica dos esfregaços e “imprints” e lesões que apresentam baixo número de parasitos (Pirmez et al., 1999; Weigle et al., 2002).

A reação intradérmica de Montenegro foi um teste altamente sensível (100%). Todos os pacientes com LTA apresentaram reação positiva. Entretanto, a especificidade foi extremamente baixa para um teste (65%). Dos 57 pacientes negativos, 20 (35%) apresentaram reações positivas com endurações entre 9 a 16 mm. Novamente, as 20 amostras discordantes foram analisadas pelas PCRs com os marcadores para o gene humano ($\beta 1$ - $\beta 2$) e para *Leishmania* sp. Como os DNAs estavam íntegros e as reações foram negativas em todas as amostras, não descartamos a idéia de estes pacientes apresentarem alguma sensibilidade à solução salina

fenolada utilizada como solvente e conservante no preparo do antígeno de Montenegro, visto que nenhum deles tinha sido tratado para LTA previamente ou realizado o teste anteriormente. Reações alérgicas ao conservante do antígeno utilizado na reação intradérmica e resultados discordantes entre IDRM e outros métodos também já foram observados por outros autores (Kar, 1995; Deps, 1998; Marzochi et al., 1999; Machado et al., 2002; Fagundes et al., 2007). Além disso, pacientes que vivem em regiões endêmicas ou já tiveram a doença e foram tratados podem apresentar 97% a 100% de positividade (Klaus et al., 1999; Ramos-e-Silva e Jacques, 2002). Portanto, o valor diagnóstico da IDRM, é limitado principalmente em pacientes de região endêmica. Devido a esses fatores de interferência, recomenda-se muita cautela na interpretação dos resultados da reação de Montenegro, visto que é um teste muito solicitado.

O exame histopatológico não foi contemplado nas análises estatísticas, pois foi realizado em apenas 71 amostras. Essas amostras foram positivas em 14 pacientes, negativas em 43 e sugestivas em 14 pacientes. Embora em menor número de amostras analisadas, mas foi suficiente para verificar a dificuldade de detectar amastigotas. Outros estudos também relatam a dificuldade na visualização dos parasitos, tanto na pesquisa direta pela coloração de Giemsa como em preparados histológicos, pela pouca quantidade de parasitos e pelo tamanho dos mesmos (Cuba et al., 1981; Pirmez et al., 1999, Weigle et al., 2002).

A correlação dos dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com o diagnóstico da LTA (Tabela 7) revelou dados interessantes. O diagnóstico foi confirmado em uma população alvo típica para LTA, previamente descrita (Grimaldi and Tesh, 1993; Gontijo and Carvalho, 2003; Chagas et al., 2006). A maioria são indivíduos do sexo masculino (69%) em idade produtiva (15-54 - 54%). Vivem em áreas rurais (50%), com lesões recentes (92%) predominantemente em braços/mãos e pernas/pés (67%).

Apesar desse estudo não abranger detalhes de um estudo epidemiológico propriamente dito, os resultados observados nesse grupo de pacientes parecem apontar as mesmas conclusões observadas em estudos realizados por Falqueto e Sessa, 1991; Passos et al., 1999. Os fatos mais relevantes foram:

a) mulheres (31%) e crianças (15%) também foram acometidas, fato que pode relacionar-se à transmissão peridomiciliar e intradomiciliar. Dados epidemiológicos semelhantes foram reportados por vários pesquisadores, mesmo em diferentes regiões (Gomes et al., 1992; Tolezano, 1994; Passos et al., 1999; Basano e Camargo, 2004).

b) pacientes com múltiplas lesões, que podem ser relacionadas a várias picadas do inseto ou ainda à expansão da lesão inicial em formar nódulos, que se rompem e criam novas lesões. Esse quadro é muito observado na região de Sorocaba.

c) As regiões do corpo onde ocorreram a maior frequência de picadas foram os locais mais expostos, como braços e pernas, seguidos pela região do tórax e cabeça (envolvendo a região dos olhos, testa e orelhas).

d) Apesar do tempo entre o aparecimento da lesão e a realização do diagnóstico variar de 1 a 12 meses, a maioria dos pacientes procurou os serviços de saúde nos primeiros 6 meses de lesão. Fato de crucial importância, para o tratamento precoce, impedindo a manifestação de quadros graves.

e) As regiões urbanas e periurbanas analisadas em nosso estudo ainda mantêm muita proximidade com a mata (modificada) ou resíduo de mata. Além disso, existem relatos dos pacientes com atividades ligadas à zona rural, como trabalhos e passeios.

As características clínicas e epidemiológicas dos 57 pacientes sem LTA foram diferentes. As amostras foram regularmente distribuídas

entre homens (56%) e mulheres (44%) e igualmente distribuídos em idade produtiva (15-54 - 55%). Todos estavam igualmente distribuídos em áreas urbana (37%), periurbanas (25%) e rural (38%). Apesar da maioria dos casos apresentar lesão única e recente (65%), lesões antigas foram observadas em 35% dos casos e predominantemente localizadas nas pernas/pés (62%). O diagnóstico clínico foi determinado em apenas 15 desses pacientes (4 com carcinoma, 5 com infecção fúngica, 2 com úlcera varicosa, 1 com tuberculose e 3 com processo crônico de etiologia não definida). Entretanto para a maioria dos casos não foi possível determinar o diagnóstico definitivo.

6. Conclusões

Este estudo mostrou que a PCR é um método altamente sensível e específico para compor o diagnóstico diferencial das leishmanioses. Tem efetiva capacidade de genotipar os parasitos presentes em diferentes amostras biológicas como aspirados de medula e linfonodo, biópsias ou necrópsias de órgãos.

Após a padronização da metodologia, o diagnóstico da LVA e LTA pôde ser realizado não só para detectar o parasito como também para identificar a *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis* em cães sintomáticos e assintomáticos e em pacientes humanos.

Portanto, esse trabalho reforça a idéia, já preconizada por outros grupos e centros de referência, da inclusão da PCR no diagnóstico das leishmanioses, visando determinar a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção. Esses dados ainda enfatizam o potencial uso deste procedimento em Programas de Vigilância e Controle da LVA contribuindo para o direcionamento das ações de vigilância, visto que a PCR é um procedimento rápido e eficiente.

7. Referências Bibliográficas

Aguiar GM, Vilela ML, Soucasaux T. Aspectos da ecologia dos flebotomíneos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro. V. Preferências alimentares (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1986; 81: 477-479.

Alencar JE, Dietze R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: Veronesi, R. Doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro, Guanabara koogan. 1991; p.706-717.

Amato VS, De Paula JG, Boulos MIC, Nicodemo EL, Boulos M, Amato Neto V. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. Rev Bras Méd. 1996; 53: 202-214.

Amato VS, Duarte MIR, Nicodemo AC, Carvalho LV, Pagliari C, Matta VLR. et al. An evaluation of clinical, serological, anatopathological and immunohistochemical finding for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1998; 40:23-30.

Amin M, Manisali M. Cutaneous leishmaniasis affecting the face: report of a case. J Oral Maxillofac Surg. 2000; 58:1066-1069.

APASFA Associação Protetora de Animais São Francisco de Assis. Disponível em <http://www.apasfa.org/quem/leishm.html> [abril de 2008].

Andrade ASR, Gomes RF, Fernandes O, Melo MN. Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. Acta Tropica. 2001; 78:261-267.

Anthony RL, Christensen HA & Johnson CM. Micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of New World leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1980; 29:190-194.

Armstrong TC. & Patterson JL, Cultivation of *Leishmania braziliensis* in an economical serum-free medium containing human urine. J Parasitol. 1994; 80:1030-1032.

Ashford RM. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clin Dermatol. 1996; 14:523-532.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol. 2000; 30:1269-1281.

Barros GC, Sessa PA, Mattos EA, Carias VRD, Mayrink W, Alencar JTA, et al. Foco de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Viana e Cariacica, Estado do Espírito Santo, Brasil. Rev Saúde Pública. São Paulo. 1985; 19: 46-153.

Barros MBL, Schubach A, Francesconi-do-Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach TMP, Conceição-Silva F, et al. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. Acta Tropica. 2005; 93:41-47.

Basano AS & Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Rev Bras Epidemiol. 2004; 7:328-336.

Belli A, Rodrigues B, Aviles H, Harris E. Simplified polymerase chain reaction detection of New World *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1998; 58:102-109.

Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last ten years. Clin Infect Disease. 1997; 24:684-703.

Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, et al. Canine Leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. Amer J Trop Med Hyg. 1996; 55:273-277.

Bittencourt A, Barral A & Costa JML. Tegumentary leishmaniasis in childhood. Ped Dermatol. 1996; 13:455-463.

Bogdan C, Rollinghoff M, Solbach W. Evasion strategies of *Leishmania* parasite. Parasitol Today. 1990; 6:183-187.

Botelho ACC, Tafuri WL, Genaro O, Mairink W. Histopathology of human American cutaneous leishmaniasis before and after treatment. Rev Soc Bras Med Trop. 1998; 31:11-18.

Brandão-Filho SP & Shaw JJ. Molecular tools versus parasite isolations for evaluating the hosts of *Leishmania braziliensis*. Trends in Parasitology. 2006; 22:500-501.

Camargo Neves VLF, Gomes AC, Antunes JLF. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2002; 35: 299-306.

Camargo-Neves VLF, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spnola RMF, et al. Use of spation analysis tools in he epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 1998-1999. *Cadenos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 2001; 17:1263-1267.

Capelli G, Baldelli R, Ferroglio E, Genchi C, Gradoni L, Gramiccia M, Maroli M, Mortarino M, Pietrobelli M, Rossi L, Ruggiero M. Monitoring of canine leishmaniasis in northern Italy: an update from a scientific network. *Parassitologia*. 2004; 46:193-197.

Carvalho M de L, de Andrade AS, Fontes CJ, Hueb M, de Oliveira Silva S, Melo MN. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. *Acta Trop*. 2006; 98:277-285.

Castro RM. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana pela anfotericina b – a propósito de 70 casos. *An Bras Dermat*. 1972; 47:229-233.

Chagas AC, Pessoa FAC, Medeiros JF, Py-Daniel V, Mesquita EC, Balestrassi DA. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em uma vila de exploração de minérios - Pitinga, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. *Rev bras epidemiol*. 2006; 9:186-192.

Chatterjee M, Baneth G, Jaffe CL, Sharma V, Mandal C. Diagnostic and prognostic potential of antibodies against O-acetylated sialic acids in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999; 70:55-65

Costa CHN, Tapety CMM, Werneck GL. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40:415-419.

Coura JR, Castro GB, Grimaldi Jr G. Disseminated American Cutaneous Leishmaniasis in a Patient with AIDS. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987; 82:581-582.

Cruz AK, Tosi LRO. Molecular biology. Clin Dermatol. 1996; 14:533-540.

Cuba CC, Marsden PD, Barreto AC, Rocha R, Sampaio RN and Patzlaff L. Parasitological and immunological diagnosis of American (mucocutaneous) leishmaniasis. Bulletin of the Pan American Health Organization. 1981; 15:249-259.

Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. Am J Trop Med Hyg. 1994; 50:296–312.

Cupolillo E, Momen H, Grimaldi Jr G. Genetic diversity in natural population of New World *Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz, RJ. 1998; 93:663-668.

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, 2006. “II Informe técnico: Leishmaniose visceral americana” 48 pp. [On line]. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br>. [Junho de 2007].

Da-Cruz AM, Azeredo-Coutinho KB. Leishmaniose tegumentar americana. In: Batista RS, Gomes AP, Igreja RP, Huggins RP. Medicina Tropical,

abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias. 1 ed. Ed. Cultura Médica, 2001; 1:131-140.

Da-Cruz AM, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho Z, Machado ES, Coutinho SG. Cellular immune responses to *Leishmania braziliensis* in patients with AIDS-associated American cutaneous leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000; 94:569-571

De Bruijn MHL & Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania brasiliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Tropica. 1992; 52:45-58.

Deane LM, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. O Hosp. 1955; 47:75-87.

Deane LM, Deane MP. Visceral leishmaniasis in Central and South América. Arq. Hig. Saude Publica. 1964; 29:89-94.

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

Delgado O, Cupolillo E, Bonfante-Garrido R, Silva S, Belfort E, Grimaldi Jr G, et al. Cutaneous leishmaniasis in Venezuela caused by infection with a new hybrid between *Leishmania (Viannia) brasiliensis* and *L. (V.) guyanensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. RJ. 1997; 92:581-582.

Deps PD. Estudo comparativo entre o antimonio de N metilglucamina e o estibogluconato de sódio BP88® no tratamento da leishmaniose cutânea

localizada [dissertação de Mestrado]. Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo; 1998. 102p.

Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinical in dermatology*. 1996; 14:417-423.

Di Lella F, Vincenti V, Zennaro D, Afeltra A, Baldi A, Giordano D, et al. Mucocutaneous leishmaniasis: report of a case with massive involvement of nasal, pharyngeal and laryngeal mucosa. *Int J Oral and Maxillofac Surg*. 2006; 35:870-872.

Dorval ME, Oshiro ET, Cupollilo E, Castro AC, Alves TP. Occurrence of American tegumentary leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State associated to the infection for *Leishmania* (*Leishmania*). *Am Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39:43-46.

Dos Santos SO, Arias JR, Hoffman M, de Paiva H, Furlan MB, Ferreira WF, et al. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul State. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36:633-634.

Dowlati Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspects. *Clin Dermatol*. 1996; 14:425-431.

Fagundes A, Marzochi MC, Perez M, Schubach A, Ferreira A, Silva JP, et al. Skin reactivity to thimerosal and phenol-preserved Montenegro antigen in Brazil. *Acta Trop*. 2007; 101:25-30.

Falqueto A & Sessa PA. Leishmaniose tegumentar americana In: Veronesi R. Doenças Infecciosas e Parasitárias. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan AS. 1991; Cap.89: 750-762.

Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi G, Sessa PA, Carias VRD, et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado de Espírito Santo, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986; 81:155-163.

Fernandes O, Bozza M, Pascale JM, de Miranda AB, Lopes UG and Degraive WM. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania (Viannia)*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996; 91:279-284.

Forattini OP, Pattoli DBG, Rebello EX, Ferreira AO. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose no estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Pública. 1972; 6: 431-433.

Fu G & Kolesnikov AA. *Leishmania gymnodactyli* and *Leishmania infantum* minicircles contain the same guide RNA genes as do minicircles of *Leishmania tarentolae*. Mol Biochem Parasitol. 1994; 67:171-174.

FUNASA, 2002. http://www.funasa.gov.br/epi/pdfs/situação_doenças.pdf.

Furtado T. Critérios para diagnóstico de LTA. Anais Brasileiros de Dermatologia. 1980; 65:51-86.

Galati EB, Nunes VL, Rego-Junior FA, Oshiro ET, Chang MR. Phlebotomines (Díptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev. Saúde Pública. 1997; 31:378-390.

Galimbertti MZ, Katz G, Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Casanova C; Costa AI, et al. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 1993; 32 supl 1:217.

Genaro O. Leishmaniose tegumentar americana. In: Neves DP, Melo LA, Genaro O, Linardi PM. Parasitologia Humana. São Paulo: Atheneu. 2002; p.36-53.

Gomes AC, Yamamoto YI, Capinzaik AN, Amaral NMM, Guimarães AJG. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana, prevalência/incidência da infecção nos municípios de Pedro de Toledo e Miracatu, SP, Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1992; 34:149-158.

Gomes AHS, Ferreira IMR, Lima MLSR, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MFL, et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. Vet Parasitol. 2007;144:234-241.

Gonçalves CC, Reiche EM, De Abreu Filho BA, Silveira TG, Felizardo TC, Maia KR, et al. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a western blot for diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2002; 66:91-102.

Gontijo B & Carvalho ML Ribeiro. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36:71-80.

Górgola M, Castrillo JM, Guerrero MF. Visceral leishmaniasis in patients with AIDS: Report of three cases treated with pentavalent antimony and interferon gama. Clin Infec Disease. 1993; 17:57-58.

Gradoni L, Scalone A, Gramiccia M, Troiani M. Epidemiological surveillance of leishmaniasis in HIV-1-infected individuals in Italy. *AIDS*. 1996; 10:785-791.

Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*. 1996; 34:257-272

Grimaldi G Jr, David JR, McMahon-Pratt D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Higy*. 1987; 36:270-287.

Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Higy*. 1989; 41:687-725.

Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for the future research. *Rev Clin Microbiol*. 1993; 6:230-250.

Grimaldi G, McMahon-Pratt D. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 1996; 91:37-42.

Harris E, Kropp G, Belli A, Rodrigues B, Agabian N. Single-step multiplex pcr for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol*. 1998; 36:1989-95.

Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol*. 1995; 21:123-152.

Killick-Kendrick R, Molyneux DH, Rioux JA, Lanotte G, Leaney AJ. Possible origins of *Leishmania chagasi*. Ann Trop Med Parasitol. 1980; 74:563-565.

Klaus SN, Frankenburg S, Ingber A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis. Clin Dermatol. 1999; 17:256-260.

Koff AB & Rosen T. Treatment of cutaneous leishmaniasis. J Am Acad Dermatol. 1994; 3:693-708.

Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2002; 40:210-215.

Lainson R & Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In Petters & Killick-Dendrick. The leishmaniasis in biology and medicine; London, Academic Press. 1987; 1:1-20.

Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuvre JP, Lelièvre A, Marty P, Suffia I, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in area of endemicity in southern France. 1999; J Clin Microbiol. 37:1953-1957.

Lee CN, Cavanagh HM, Lo ST and Ng CS. Human papillomavirus infection in non-neoplastic uterine cervical disease in Hong Kong. Brit J of Biomed Science. 2001; 58:85-91

Lopes UG, Momen H, Grimaldi G Jr, Marzochi MC, Pacheco RS, Morel CM. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the

investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. J Parasitol. 1984;70:89-98.

Lopes UG, Wirth DF. Identification of visceral *Leishmania* species with cloned sequences of kinetoplast DNA, Mol Biochem Parasitol. 1986; 20: 77-84.

Lutz A & Neiva A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomíneo*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1912; 4:84-95.

Macedo AM, Melo MN, Gomes RF, Pena SD. DNA fingerprints, a tool for identification of the relationships between species and strains of *Leishmania* . Mol Biochem Parasitol. 1992; 53:63-70.

Machado ES, Braga Mda P, Da Cruz AM, Coutinho SG, Vieira AR, Rutowitsch MS, et al. Disseminated American muco-cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis* in a patient with AIDS: a case report. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992; 82:487-492.

Machado P, Araujo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira Jr A, Bittencourt A, et al. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. Clin Infect Dis. 2002; 34:69-73.

Magalhães AV, Moraes MAP, Raick AN, Llanos-Cuentas EA, Costa JML, Cuba CC, et al. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania b. braziliensis*. Padrões histológicos e estudo evolutivo das lesões. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1986; 28:253-262.

Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP e Felger I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 2003; 41: 3147-3153.

Marques MJ, Volpini AC, Genaro O, Mayrink W and Romanha AJ. Simple form clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 2001.; 65: 902-906.

Marsden PD. Mucosal leishmaniasis (Espundia Escomel,1911). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1986; 80:859-876.

Marzochi MCA & Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil-emerging anthroponosis and possibilities for their control. Cadernos de Saúde Pública. Rio de Janeiro. 1994; 10:359-375.

Marzochi MCA, Schubach AO, Marzochi KBF. Leishmaniose tegumentar americana. In Cimerman B & Cimerman. S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. São Paulo, Atheneu. 1999; 39-64.

Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. Parasitology. 1999;119:237-246.

Mauricio IL, Yeo M, Baghaei M, Doto D, Pratlong F, Zemanova E, et al. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). Int J Parasitol 2006; 36; 757–769.

Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Clinics in Dermatology. 1999; 17:297-304.

Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES. Avaliação do PCR na investigação de *Leishmania* sp em flebotomíneos experimentalmente infectados (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Rev Inst Med trop São Paulo. 2002, 44:255-259.

Ministério da Saúde do Brasil, 2007. “Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral”. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/svs>. [Junho de 2006].

Minodier P, Noël G, Blanc P, Uters M, Retornaz K, Garnier JM. Treatment of visceral leishmaniasis in children. Med Trop. 2007; 67(1):73-78.

Moskowitz PF, Kurban AK. Treatment of cutaneous leishmaniasis: retrospectives and advances for the 21st century. Clin Dermatol. 1999; 17:305-315

Motta AC, Lopes MA, Ito FA, Carlos-Bregni R, de Almeida OP, Roselino AM. Oral leishmaniasis: a clinicopathological study of 11 cases. Oral Dis. 2007; 13:335-340

Navin TR; Arana FE, De Mérida AM, Arana BA, Castilho AL, Silvers DN. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. Am J Trop Med Hyg. 1990; 42:36-42.

Oliveira JGS, Novais FO, Oliveira CI, Cruz Junior AC, Campos LF, Rocha AV et al. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta Tropica*. 2005; 94:55-59.

Orsini M, Silva M, Da Luz ZMP, Disch J, Fernandes O, Moreira D, et al. Identification of *Leishmania chagasi* from skin in *Leishmania*/HIV co-infection: a case report. *Rev Soc Bras Méd Trop*. 2002; 35:1-7.

Passos VMA, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CMF, Romanha AJ. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Tropica*. 1999; 72:251-258.

Pearson DP, Souza AQ, Jeronimo SMB. *Leishmania* species: Visceral (Kala-Azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. In: Mandell GL, Bennet JE, Dulin R. Principles and practice of infectious diseases. New York: Churchill Livingstone; 2000;2831- 2844.

Pinheiro RO. Leishmaniose tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. *Infarma*. 2004; 16 :77-80.

Pirmez C, da Silva Trajano V, Paes-Oliveira Neto M, da-Cruz AM, Gonçalves-da-Costa SC, Catanho M, et al. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 1999;37:1819-1823.

Posada-Vergara MP, Lindoso JA, Tolezano JE, Pereira-Chioccolla VL, Silva MV and Goto H. Tegumentary leishmaniasis as a manifestation of immune

reconstitution inflammatory syndrome in 2 patients with AIDS. J Infect Dis. 2005; 192:1819-1822.

Postigo C, Lamas R, Zarco C, Rubio R, Pulido F, Costa JR, et al. Cutaneous Lesions in patients with visceral leishmaniasis and HIV infection. J Infect. 1997; 35: 265-8.

Rabello A, Andrade MO, Dish J. Co-infecção *Leishmania*/HIV. Rev Soc Bras. Med Trop. 1998; 31: 81.

Ramos-e-Silva M & Jacques CMC. Leishmaniasis and other dermatozoonoses in Brazil. Clin Dermatol. 2002; 20:122-134.

Raso P & Genaro O. Leishmaniose tegumentar Americana. In: Brasileiro Filho G. Bogliolo Patologia. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000; 33:1207-1214.

Ravel S, Cuny G, Reynes J, Veas F. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. Acta Trop. 1995; 59:187-196.

Reed SG. Diagnosis of leishmaniasis. Clin Dermatol. 1996; 14:471-478.

Reithinger R & Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. Am J Med Hyg. 1999; 61:530-541.

Rey L. Parasitologia – parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3ª ed. Rio de Janeiro: Editora Koogan. *Leishmania* e leishmaníases: os Parasitos. 2001; 214 – 216.

Ribeiro ALP, Drummond JB, Volpini AC, Andrade AC, Passos VMA. Eletrocardiographic changes during low-dose, short-term therapy of cutaneous leishmaniasis with the pentavalent antimonial meglumine. Braz J Med Biol Res. 1999; 32:297-301.

Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania* using isoenzymes: suggestions for a new classification. Ann Parasitol Hum Omp. 1990; 65:111-125.

Rittig MG, Bogdan C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. Parasitol Today. 2000; 16:292-297.

Rocha RD, Gontijo CM, Elói-Santos SM, Teixeira Carvalho A, Corrêa-Oliveira R, Marques MJ, et al. Anti-live *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* promastigote antibodies, detected by flow cytometry, to identify active infection in american cutaneous leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop. 2002;35:551-562.

Rodrigues EHG. Validação de abordagem molecular para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco. Recife. [Dissertação de Mestrado]. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife. Pernambuco. 2000; 168p.

Rodrigues MLO, Costa RS, Souza CS, Foss NT, Roselino AMF. Nephrotoxicity to antimoniate (Glucantime) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1999; 41:33-37.

Rodrigues N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom B, J. Convit. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. J Clin Microbiol. 1994; 32:2246-2251.

Romero GA, Ishikawa E, Cupolillo E, Toaldo CB, Guerra MV, Paes MG, et al. The rarity of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* among patients from the Manaus region of Amazonas state, Brazil, who have cutaneous leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol. 2002; 96:131-136.

Russell R, Iribar MP, Lambson B, Brewsgteer S, Blackwell JM, Dye C, et al. Intra and Inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. Mol Biochem Parasitol. 1999; 103:71-77.

Safaei A, Motazedian MH, Vasei M. Polymerase chain reaction for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in histologically positive, suspicious and negative skin biopsies. Dermatology. 2002; 205:18-24.

Salman SM, Rubeiz N, Kibbi A. Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. Clin Dermatol. 1999; 17:291-296.

Sambrook J, Fritch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory manual. V. 32nd edition. New York: Cold Spring Harbor; 1989.

Sampaio RNR, Salaro CP, Resende P, De Paula CDR. Leishmaniose tegumentar associada à AIDS; relato de quatro casos. Rev Soc Bras Med Trop. 2002; 35:651-654.

Santos GPL. Estudo da população canina e da fauna flebotomínea em áreas de leishmaniose tegumentar no município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro. Uma abordagem epidemiológica. [dissertação de Mestrado]. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1998.

Savani ESMM, Galati EAB, Camargo MCGO, D'Auria SRN, Damaceno JT, Balduino SA. Inquérito sorológico sobre leishmaniose tegumentar Americana em cães no Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Pública. 1999; 33:629-631.

Schallig HDFH & Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. Trop Med Intern Health 2002; 7: 641–651

Schubach A, Cuzzi-Maya T, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C, Oliveira-Neto MP. Leishmaniasis of glans penis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 1998a; 10:226-228.

Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraive W, Pirmez C, Grimaldi G Jr, et al. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. J Infect Dis. 1998b; 178:911-914.

Sessa AP, Falqueto A, Varejão JBM. Tentativa de controle da leishmaniose tegumentar americana por meio do tratamento dos cães doentes. Cad. Saúde Pública. 1994; 10:457-476.

Silveira FT, Blackwell JM, Ishikawa EA, Braga R, Shaw JJ, Quinnell RJ, et al. T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. *Parasite Immuno*. 1998; 20:19-26.

Silveira FT, Ishikawa EA, De Souza AA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite*. 2002; 9:43-50

Sotto MN, Requena JM, Moreira D, Alonso C. Assignment of genes to *Leishmania infantum* chromosomes: Karyotype and ploidy. *FEMS Microbiol Lett*. 1995; 129:27-32.

Taniguchi HH, Chioccola VLP, Cunha EA, Gomes AHS, Araújo MFL, Bisugo MC. et al. Leishmaniose tegumentar americana (LTA) por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em paciente de região endêmica do Estado de São Paulo, Brasil: Relato de caso. In: VI Encontro do Instituto Adolfo Lutz; Saúde Pública, Pesquisa e Responsabilidade Social de 3 a 6 outubro de 2005; São Paulo. *Rev. Inst Adolfo Lutz*. 64:172.

Tavares CC, Grimaldi G Jr, Cseko T, Yara M. Molecular karyotype analysis and mapping of housekeeping to chromosomes of selected species complexes of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992; 87(4):477-486.

Tolezano JE, Luvizotto MCR, Uliana SRB, Araújo MFL, Taniguchi HH, Barbosa JAR, et al. Leishmaniose visceral americana (LVA) em Araçatuba, região oeste do estado de São Paulo. *Investigações laboratoriais e*

diagnóstico de uma doença emergente em terras paulistas. Rev Soc Bras Med Trop. 1999; 32:218.

Tolezano JE. Ecoepidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994; 89:427-434.

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

Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing american cutaneous leishmaniasis. Acta Tropica. 2004; 90:31-37.

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

WHO. (World Health Organization). Control of leishmaniases: Report of WHO expert committee. Technical report series 793. Geneva; 1990.

WHO .Division of Control of Tropical Diseases. Epidemiological analyses of retrospective cases of leishmania/HIV co-infection. World Health Organization/Leish. 1996.39.

WHO (World Health Organization). Division of control of tropical disease. Leishmaniasis control. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>. [junho de 2007].

Wilson SM. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: field application and practicalities. Ann Trop Med Parasitol. 1995; 89:95-100

Wirth DF & McMahon-Pratt D. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. Proc Natl Acad Sci. USA. 1982; 79:6999-7003.

Zer R, Yaroslavski I, Rosen L, Warburg A. Effect of sandfly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. Int J Parasitol. 2001; 31:810-814.

ANEXOS

ANEXO 1

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CEPIAL

São Paulo, 10 de janeiro de 2006 .

Ilmo(a) Sr(a).: APARECIDA HELENA DE SOUZA GOMES

Coordenador(a) do Projeto de Pesquisa: **EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES NA REGIÃO DE SOROCABA E BOTUCATU, DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES DE LEISHMANIAS ISOLADAS. CONTRIBUIÇÃO AO DIAGNÓSTICO E AS AÇÕES DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA E SANITÁRIA NO CONTROLE DA LTA E LVA EM REGIÕES ENDÊMICAS PARA LTA E VULNERÁVEIS PARA LVA**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL), em reunião ordinária do mês JANEIRO, apresentou o PARECER, enquadrando o referido projeto na categoria **APROVADO**, de acordo com a Resolução 196/96 sobre Pesquisas Envolvendo Seres Humanos / CNS / MS , Brasília, 1996.

Atenciosamente


Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felipe
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto Adolfo Lutz
CEPIAL

ANEXO 2

Aprovação da Comissão Técnica Científica



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CTC / IAL



APROVAÇÃO DE PROJETOS DE PESQUISA

Ref.: PROJETO CCD/LR 03/2005

Título:

Epidemiologia das leishmanioses na região de Sorocaba e Botucatu, diagnóstico laboratorial e caracterização das espécies de Leishmania isoladas. Contribuição às ações de vigilância epidemiológica e sanitária no controle da LTA e LVA

Coordenadora:

Aparecida Helena de Souza Gomes

Senhora Coordenadora,

Comunico que o projeto supra citado foi cadastrado no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após sua aprovação na CCD/LR e CEPAL.

Início do projeto: **05/2005**

Término estimado: **03/2008**

Recebido no CTC/IAL em: **24/11/2006**

Cadastrado no CTC/IAL em: **29/11/2006**


ADRIANA BUGNO
Presidente do CTC/IAL

São Paulo, 29/11/2006

Via 1: Coordenador
Via 2: CCD
Via 3: CTC

ANEXO 3

PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis

Veterinary Parasitology 144 (2007) 234-241



PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis

Aparecida H.S. Gomes, Isabelle M.R. Ferreira, Maria L.S.R. Lima, Elaine A. Cunha, Andrea S. Garcia, Maria F.L. Araújo, Vera L. Pereira-Chiocola *

Laboratório de Parasitologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355-8º andar, CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brazil

Received 12 July 2006; received in revised form 7 October 2006; accepted 11 October 2006

Abstract

Leishmaniasis are endemic in many countries, mainly in rural areas. In Brazil, *Leishmania* infection is responsible for many cases of leishmaniasis, including recent reports in urban regions. Despite their sensitivity, traditional serological and parasitological methods for detecting leishmaniasis have proven inadequate for species discrimination. This study aimed to identify *Leishmania* species in biological samples by a fast methodology, avoiding “in vitro” cultivation. Knowledge of the *Leishmania* species is an important tool in regions where both New World visceral leishmaniasis (VL) and cutaneous leishmaniasis (CL) are prevalent. As these new foci appear in areas not traditionally endemic for VL, the main problem is to distinguish between true autochthonous infections and infections acquired in other well-known endemic areas. Since, domestic dogs are known to be the main VL and CL reservoir, they are regularly investigated in endemic areas to prevent, principally, severe and often fatal VL in humans. However, several infected dogs present no clinical signs or clinical signs similar to other canine diseases. Here, we evaluated the ability of PCR to diagnose VL and distinguish *L. (L.) chagasi* from other *Leishmania* species in domestic dogs. Samples from 114 dogs from 30 cities (São Paulo, Brazil) were divided into two groups: 44 symptomatic and 70 asymptomatic. They were assayed by parasitological methods (culture and microscopic examination) and PCR to determine *L. (L.) chagasi*, *L. (V.) braziliensis*, and in some cases, *Leishmania* spp. Parasitological tests and PCR-*L. chagasi* were concordant in 105 samples (92%). VL was confirmed in 49 dogs, while 56 had negative results. Of the 114 samples, 9 had discordant results, but were further tested by PCR-*Leishmania* spp. with positive results. VL was also confirmed in 4 dogs having negative parasitological tests and positive PCR-*L. chagasi*. Consequently, this PCR was positive for 100% (53/49) of dogs with parasites detected in parasitological tests. Also, PCR demonstrated high specificity detecting 61 dogs negative for VL. *Leishmania* infection was negative in 56 dogs, and 5 with positive culture and PCR-*Leishmania* spp. had CL since they were positive in PCR-*L. braziliensis*. This study shows the importance of including PCR in diagnosis of leishmaniasis by differential diagnosis contributing to the surveillance and control of VL programs.

© 2006 Published by Elsevier B.V.

Keywords: American visceral leishmaniasis; American cutaneous leishmaniasis; Differential diagnosis in dogs; Genotyping; PCR

1. Introduction

The genus *Leishmania* causes a wide spectrum of human diseases, ranging from self-limited cutaneous to the more severe diffuse cutaneous and visceral forms, as a consequence of the complex host immunological response (Grimaldi and Tesh, 1993; Lainson and Shaw, 1998).

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3068 2889; fax: +55 11 3068 2889.

E-mail address: pchiocola@ial.sp.gov.br (V.L. Pereira-Chiocola).

Leishmania species in Latin-America belong to two different taxonomic groups. The first is the sub-genus *Leishmania*, composed of *L. mexicana* and *L. amazonensis*, responsible for localized or diffuse cutaneous; and *L. chagasi*, the causative of the New World viscerotropic leishmaniasis. *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* and others comprise the second sub-genus *Vannia* group and cause cutaneous or mucocutaneous lesions (Degraeve et al., 1994; Lainson and Shaw, 1998).

The traditional diagnosis of Leishmaniasis consists of serological tests (ELISA and Immunofluorescence), direct examination of smears after Giemsa staining, "in vitro" culture and histological techniques (Grimaldi and Tesh, 1993; MSB, 2006). Despite its sensitivity, the traditional diagnosis has been found inadequate for species discrimination. For this purpose immunological methodologies, such as serodeme or monoclonal antibodies, have been developed, but they present limitations such as cross-reactions among other phylogenetic similar species (Grimaldi and McMahon-Pratt, 1996).

The variability of *Leishmania* has been traditionally studied by a multilocus enzyme electrophoresis technique (MLEE, isoenzyme analyses) based on 15 enzymes. The amino acid polymorphism was responsible for change in enzyme mobility producing different phenotypes (or zymodemes) (Rioux et al., 1990). This taxonomic methodology has been regularly used in epidemiological studies (Cupolillo et al., 1994). Generally, the definitive species identification is determined within 2 or 3 months. This technique requires the isolation of the parasite and its growth in culture medium, but many promastigotes isolates do not amplify in culture medium. Additionally, the culture is rarely done in routine diagnosis. Thus, this method is time-consuming, requiring culture facilities and individual expertise (Degraeve et al., 1994; Schallig and Oskam, 2002).

Knowledge of the *Leishmania* species is particularly important in regions where both New World visceral leishmaniasis (VL) and New World cutaneous leishmaniasis (CL) are prevalent (Schallig and Oskam, 2002). Recent findings showed *L. chagasi* dispersion in endemic areas for *L. braziliensis*, the causative agent of CL in Sao Paulo State, Brazil (Camargo-Neves, 2004; CVE, 2006). As these new foci appear in areas not traditionally endemic for VL, the main problem is to distinguish between true autochthonous infections and infections acquired in other well-known endemic areas. Since domestic dogs known to be the main VL and CL reservoir, they are regularly investigated in endemic

areas to prevent, principally, severe and often fatal VL in humans (Grimaldi and Tesh, 1993). However, the canine VL surveillance is limited since most infected dogs present no clinical signs or clinical signs similar to other canine diseases. Studies analyzing sera from symptomatic and asymptomatic dogs with VL showed the difficulty in determining the proportion of infected dogs that develop a detectable specific immune response. The asymptomatic ones often remain seronegative or borderline positive (Ashford et al., 1995; Berrahal et al., 1996; Paula et al., 2003).

Despite the significant contribution of a variety of molecular methods for identifying *Leishmania* (Rodriguez et al., 1994; Fernandes et al., 1996; Schallig and Oskam, 2002; Volpini et al., 2003; Marfurt et al., 2003), these methods are time consuming and expensive for diagnostic purposes. In contrast, a specific PCR-based method is appealing as it is rapid, sensitive, and specific, avoiding culturing of parasites, thus being suitable for Leishmaniasis surveillance programs that require efficient laboratorial response for rapid and effective actions.

This study aimed to determine *Leishmania* species in biological samples by a fast and simple methodology, avoiding "in vitro" cultivation thus; we evaluated the efficacy of PCR for New World VL diagnosis and its capacity to distinguish *L. chagasi* from other *Leishmania* species in domestic dog samples. This PCR amplifies a fragment present in the highly reiterated minicircles of DNA, having been shown to be highly sensitive and specific for VL caused by *L. infantum* in samples from Mediterranean region (Lachaud et al., 2002). We opted for these primers on the basis of the current taxonomy of the *L. donovani* complex, which has three designated species, *L. donovani*, *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) and *L. archibaldi* (Mauricio et al., 2006).

2. Material and methods

2.1. Strains of parasites and canine samples

VL diagnosis was performed in 114 dogs from October 2003 to November 2005. All dogs analyzed in this study were selected considering epidemiological risk factors for VL, such as proximity of other infected dogs as well as signs or symptoms of the disease. The dogs lived in different localities of Sao Paulo State, including 30 cities (small and medium size) endemic for CL, as well as having endemic conditions for VL. The dogs were divided into two groups according to symptomatology. Group I, composed of 44 dogs

referred to as “symptomatic”, had strong clinical signs for VL (at least four signs) including exfoliative dermatitis, cutaneous ulcers and/or nodules, lymphadenopathy, splenomegaly, hepatomegaly, weight loss, lameness, anorexia, fever, abnormal nail growth, muscle wasting, or pale mucous membranes. These dogs were culled, and liver, spleen and lymph node necropsy fragments were sent to our laboratory to confirm the clinical diagnosis. Group II, composed of 70 dogs referred to as “asymptomatic”, were asymptomatic or had minimal clinical signs for VL, including clinical signs for other canine diseases. The common signs were nodules, cutaneous ulcers, weight loss, or abnormal nail growth. Lymph node aspirates and/or cutaneous biopsy samples were collected to confirm VL diagnosis. All analyzed samples were collected in aseptic conditions, immediately added to tubes containing 1–2 ml of a sterile 0.85% NaCl and 200 µg/ml gentamicin, sent to the laboratory within 48 h, and immediately processed. Each sample was divided into three aliquots. Two of which were processed for parasitological methods (culture and microscopic examination) and the third for DNA extraction. For PCR specificity and as positive control, the following WHO reference strains were used: *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD), *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/67/PH8), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/2903), and *Trypanosoma cruzi* (Y strain). *Leishmania* strains were grown at 25 °C in Eagle’s medium, supplemented with 292 mg/l L-glutamin, 110 mg/l sodium pyruvate, 2.2 g/l sodium bicarbonate, 0.02% hemin, 10% heat-inactivated fetal calf serum and 200 µg/ml gentamicin. *T. cruzi* epimastigotes, strain Y were grown at 28 °C and cultivated in LIT (liver infusion tryptose medium) containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (Camargo, 1964). In the log curve phase, 10⁸ parasites were harvested, washed twice in phosphate-buffered saline (pH 7.2) at 1000 g for 10 min. The parasite pellets were used to DNA extraction. The Ethics Committee of Instituto Adolfo Lutz approved this study.

2.2. Parasitological diagnosis

A portion of samples was plated onto a glass slide, fixated with methanol, and stained with Giemsa according to WHO (2006). The presence of amastigotes was observed microscopically (magnification, 1000×). The second portion was placed in *in vitro* cultures. Tissue fragments were previously homogenized by a sterile plastic pestle and placed into 1.5 ml tubes. The samples were placed into two tubes containing two biphasic media, one of which was 30% rabbit

defibrillated blood in agar potato infusion (Ducrey) and the other 5–15% rabbit defibrillated blood in agar base pH 6.8 (BAB). Both media were supplemented with 2 ml brain heart infusion medium (BHI), 5% sterile human urine and 200 µg/ml gentamicin (Armstrong and Patterson, 1994). The tubes were incubated at 22 °C for 10–15 days. The presence of promastigotes was carefully observed weekly by microscope (Grimaldi and Tesh, 1993; WHO, 2006). Parasitological diagnosis was considered positive if parasites were present in at least one of the tests.

2.3. Molecular diagnosis

2.3.1. DNA extraction

Reference strain pellets and canine samples were dissolved in lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 0.5% SDS; 0.01% N-laurilsarcosyl and 100 µg/ml proteinase K. The mixtures were briefly vortex mixed and incubated at 56 °C until the complete lyses of the cells. Incubation period of each type of sample varied. Fluid substances such as lymph nodes aspirates and promastigotes were incubated for 30–120 min. Liver, spleen, lymph node fragments and biopsies were incubated for 5–24 h. DNA was extracted by phenol/chloroform/isoamylalcohol method and precipitated by isopropanol. After washing with 70% ethanol for 10 min at 10,000 × g, the DNA pellet was dissolved in ultra pure water containing RNAase 20 µg/ml. DNA concentrations extracted from reference strain were determined in OD at 260, while DNA purity was determined by the ratio of OD at 260 and 280 nm (Sambrook et al., 1989). For PCR amplification, 1 µl of reference strains DNA (85–90 ng) or 5 µl of dog samples were used as DNA template.

2.3.2. Polymerase chain reaction

The amplifications were carried out with a kit purchased from Amersham-Pharmacia-Biotech. The PCR beads were composed of 1.5 units of *Taq* DNA polymerase, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂; 200 mM of each dNTP and stabilizers as BSA. Each reaction was performed adding each DNA template and 50 pmol of each primer to a final volume of 25 µl. *L. (L.) chagasi* was determined by primers RV1 (sense) 5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3' and RV2 (antisense) 5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3', which amplified a 145 bp sequence from LT1 fragment of kDNA minicircles as target at 60 °C of annealing temperature (Ravel et al., 1995; Le Fichoux et al., 1999). *L. braziliensis* was determined by a primer pair, which amplified a 146–149 bp sequence from the

multicopy spliced leader (SL) RNA (mini-exon) gene as target in a temperature annealing at 59 °C. One primer was LU-5A (sense) 5'-TTTATGGTATGCGAAA-CTTC-3', from a conserved SL intron (55–101 nucleotides) in *Leishmania* spp. The other was LC-3L (antisense) 5'-GCCCGCG(C/T)GTCACCACCAT-3' from a variable non-transcribed spacer, which is a specific region for *L. braziliensis* (Harris et al., 1998). *Leishmania* spp. was determined in the questionable samples by a primer pair, which amplified a 120 bp sequence from the conserved region of *Leishmania* minicircle kDNA as target in an annealing temperature of 55 °C. The primers were: 150 (sense) 5'-GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA-3' and 152 (antisense) 5'-C(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAAC-CCC-3' (Passos et al., 1999). DNA purified from culture parasites was tested twice to determine species specificity. The dog samples were tested at least twice. Each amplification run contained two negative controls (ultra pure water and a negative DNA sample for *Leishmania*) and one positive control (DNA from promastigotes). A tube containing DNA from promastigotes (1 µl) and a negative DNA sample for *Leishmania* (extracted from a dog living in non-endemic area) (5 µl) as template was included in some amplification runs to verify whether any *Taq* polymerase inhibitor could result in a false negative PCR (Sambrook et al., 1989). After thermal cycles, PCR products were electrophoresed in 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. DNA fragments were visualized under UV illumination and images were analyzed by a Syngene GeneSnap Imager, version 6.05.01. The sizes of fragments were based on comparison to a 100 bp ladder.

2.4. Data analysis

PCR-*L. chagasi* sensitivity and specificity were determined considering the parasitological methods as "gold standard" and performed with the SPSS 10.0 software. "Percents of concordant results" (between PCR-*L. chagasi* and parasitological methods) were calculated as the following ratio: (number of concordant results)/(number total of samples) × 100.

3. Results

The main objective of this study was to investigate a sensitive and specific method for distinguishing *L. chagasi* from *L. braziliensis* in biological samples. PCR using specific and sensitive primers was chosen to avoid DNA hybridization or treatment with restriction enzymes. The primer pair RV1/RV2 amplifies a 145 bp sequence from LT1 fragment of *L. donovani* group kDNA minicircles (Ravel et al., 1995; Le Fichoux et al., 1999; Lachaud et al., 2002). We chose the primer pair LU-5A/LC-3L for *L. braziliensis* detection (Harris et al., 1998). The product expected was 146–149 bp.

Firstly, we determined whether RV1 and RV2 primers were specific in New World *Leishmania* species. The specificity was evaluated in the three most prevalent *Leishmania* species in Brazil (*L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*). Next, we also evaluated *T. cruzi*, the protozoa causative agent of Chagas disease because both genera have many phylogenetic similarities (Tibayrenc, 1997), also there are regions in Brazil, where both diseases are prevalent. The specificity of LU-5A and LC-3L were determined

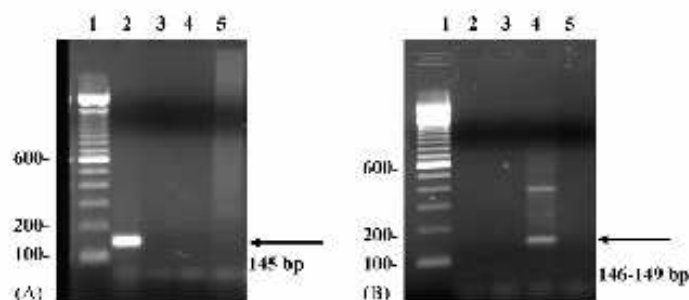


Fig. 1. Species specificity of the PCR assays for *L. (L.) chagasi* (A) and *L. (V.) braziliensis* (B). For *L. (L.) chagasi*, the RV1 and RV2 primers amplified the 145 bp product from a specific region (LT1 fragment) of kDNA minicircles of *L. donovani* minicircle kDNA. For *L. (V.) braziliensis*, the LU-5A and LC-3L primers amplified the 145–149 bp product from a variable non-transcribed spacer, and specific region from the SL-RNA gene. The DNA strains indicated below at a concentration of 85–90 ng were amplified and analyzed in electrophoresis in 2% agarose gel. Lane 1, 100 bp ladder (the lowest band shown is 100 bp); lane 2, *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD); lane 3, *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/67/PH8); lane 4, *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/2903); lane 5, *Trypanosoma cruzi* (Y strain).

Table 1

Comparison of parasitological methods and PCR for *L. chagasi* in symptomatic (group I) and asymptomatic (group II) dogs

Dogs	Sample type	Total	Results (parasitological methods (Pm) and PCR- <i>L. chagasi</i>)				
			Concordant			Discordant	
			Both positive	Both negative	Concordance ^a (%)	Negative Pm, positive PCR	Positive Pm, negative PCR
Group I (symptomatic and culled dogs)	Liver, spleen, lymph nodes (necropsy fragments)	44	29	13	42 (95)	0	2
Group II (asymptomatic dogs)	Lymph nodes aspirates, cutaneous biopsy	70	20	43	63 (90)	4	3
Total		114	49	56	105 (92)	4	5

^a Percent of concordant results was calculated as the following ratio: (number of concordant results)/(number total of samples) × 100.

in the same manner. As shown in Fig. 1A, RV1/RV2 primers amplified a 145 bp only in *L. chagasi*. Similarly LU-5A/LC-3L showed specificity for *L. braziliensis* (Fig. 1B).

The canine samples were processed within 48 h after collection in a simple procedure to recover most of the DNA present in samples. This process prevented inhibition of the thermostable DNA polymerase by many components found in complex biological samples (Al-Soud and Radstrom, 1998).

Samples from 44 symptomatic dogs with classical signs for VL (group I) presented the following results: 29 dogs had positive results for parasitological methods and PCR-*L. chagasi*. Two dogs had discordant results. Parasites were detected by parasitological methods, but PCR was negative (Table 1). The results of 70 asymptomatic dogs (group II) were: 20 were positive for *L. chagasi* in PCR as well as parasitological methods. However, 7 dogs had discordant results. Four had negative parasitological tests and positive PCR-*L. chagasi*. In contrast, three dogs had negative PCR and positive culture. The concordance percent for parasitological and PCR results was 92% for all samples. Concordance for the

first and second group was 95 and 90%, respectively (Table 1).

Next, the discordant results described in Table 1 were investigated. These DNA samples were further analyzed in PCR-*Leishmania* spp., all presenting positive results. These results confirmed VL infection in four dogs having negative parasitological diagnosis and positive PCR-*L. chagasi*. They were culled, then necropsy fragments were also analyzed and were positive in both methodologies. The other five dogs (two from group I and three from group II) with discordant results had positive culture and PCR for *Leishmania* spp. As these regions are endemic for *L. braziliensis*, we decided to do another PCR, using the LU-5A/LC-3L primers. As shown in Table 2, the five samples amplified the 146–149 bp products for *L. braziliensis* showing that these dogs had cutaneous leishmaniasis.

4. Discussion

Currently, Leishmaniasis have been increasing worldwide, principally due to increases in human and domestic animal traffic. This phenomenon increases the

Table 2

CL and VL diagnostic in symptomatic (group I) and asymptomatic (group II) dogs

Dogs	Positive and parasitological method and PCR- <i>Leishmania</i> spp.	PCR (<i>Leishmania</i> species identification)	
		<i>L. chagasi</i> (RV1 and RV2)	<i>L. braziliensis</i> (LU-5A and LC-3L)
Group I (symptomatic and culled dogs)	31	29	2
Group II (asymptomatic dogs)	27	24	3
Total	58	53	5

Genotyping of positive samples in parasitological methods.

likelihood of leishmanial infection in low or non-endemic areas (Lainson and Rangel, 2005; MSB, 2006). In Brazil, approximately 2500–5000 cases of VL and 30,000–36,000 cases of CL are reported per year. In low incidence regions, such as São Paulo State, VL mortality was approximately 10% (1999–2005) (CVE, 2006; MSB, 2006).

The success of leishmaniasis transmission control programs depends on several preventive measures, such as surveillance of reservoirs, insect vectors and population. These measures in endemic regions must be rapid and efficient to prevent *L. chagasi* dispersion. In Brazil, one approach used to reduce the incidence of human VL is to cull infected dogs. The impact of such dog-culling programs on incidence of human and canine VL has been questionable and controversial (Reithinger et al., 2002; Capelli et al., 2004). Despite culling, VL incidence has increased (CVE, 2006; MSB, 2006; WHO, 2006). The failure of such control campaigns could be attributed to: (i) long delay between sample collection and exam execution (Reithinger et al., 2002); (ii) suspect samples are analyzed by parasitological, histological or serological tests whose methodologies are unable to distinguish *Leishmania* species. Consequently, sensitive and rapid diagnostic tests need to be considered. Therefore, PCR was chosen to distinguish *L. chagasi* from *L. braziliensis* in biological samples using specific and sensitive primers because other methodologies, such as hybridization, biochemistry characterizations and RFLP, have shown high sensitivity and specificity (Rodríguez et al., 1994; Fernandes et al., 1996; Schallig and Oskam, 2002; Volpini et al., 2003), but are time-consuming, and costly methods.

The targets in *Leishmania* genome include kDNA minicircles, SSU-rRNA, and SL RNA (mini-exon) gene repeat (Ramírez and Guevara, 1987; Degraeve et al., 1994; Fernandes et al., 1996; Marfurt et al., 2003). kDNA minicircles are good candidates since they present very high copy number (10,000 per cell) and contain conserved and variable sequences. Each minicircle presents approximately 800 bp. The primer pair 150/152 amplifies a sequence of the 150 bp-conserved region present in all *Leishmania* species (Degraeve et al., 1994). Another minicircle region (around 650 bp) is a variable sequence between the species. Consequently, we chose RV1/RV2 primers that amplify a sequence of the specific region for the *L. donovani* complex. Moreover, the high sensitivity (at least one parasite in 5–10 ml of blood) and specificity of these primers in blood samples from dogs with visceral leishmaniasis in the Mediterranean rendered them

strong candidates for our purpose (Le Fichoux et al., 1999; Lachaud et al., 2002). Here, RV1/RV2 primers were also specific when reference strains were assayed. No PCR product was obtained from *L. braziliensis* and *L. amazonensis* parasites, which are prevalent in several Brazilian regions, nor was a PCR product observed in *T. cruzi* epimastigotes, another kinetoplastid phylogenetically close to *Leishmania* spp.

The detection of samples with CL was made by PCR using LU-5A/LC-3L primers resulting from the SL RNA gene repeat region. This gene is present in nuclear genome as a tandem array of approximately 200 copies. Each copy contains a transcribed conserved region and a non-transcribed variable region differing among the *Leishmania* complexes in sequence and size (Fernandes et al., 1996; Harris et al., 1998). The primer sense is conserved in *Leishmania* spp. The antisense is specific to the variable region for *L. braziliensis* complex including *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, and *L. peruviana*.

We believe that the following conditions improved PCR assay sensitivity: (i) establishing a procedure to recover most of the DNA present in the samples to increase the sensitivity; (ii) canine samples were processed rapidly within 48 h of collection to prevent any *Taq* polymerase inhibition. Many components found in biological samples (blood, urine, feces and cerebrospinal liquid) inhibit the *taq*-polymerase, modifying PCR results (Al-Soud and Radstrom, 1998). Therefore, PCR reactions were performed using a mixture of a negative DNA sample with positive DNA (from positive control) as template. The results were positive, showing that no substance present in DNA samples inhibited the reaction.

The parasitological methods present complex interferences, such as bacterial contamination in cultures and difficulties in seeing the parasites fixed in glass slides after Giemsa staining. However, as the definitive a clinical diagnosis was not reached, we considered the parasitological assays as the gold standard method to determine PCR-*L. chagasi* sensitivity and specificity (Ashford et al., 1995).

Our main goal was to determine whether 44 dogs with serious symptoms from group I had VL (Table 1). Veterinarians, with donors' consent, culled dogs without previous laboratorial diagnosis for VL, on the basis of their drastic health conditions. Of the 31 culled dogs with positive parasitological tests and PCR-*Leishmania* spp., 29 (66%) had VL, confirmed by positive PCR-*L. chagasi*. The other 2 dogs had CL confirmed by PCR-*L. braziliensis* (Table 2). Among the 70 asymptomatic dogs, only 24 (34%) had a confirmed VL diagnosis. The

other 3 dogs had CL, also confirmed by PCR-*L. braziliensis* (Tables 1 and 2). The 4 dogs with negative parasitological tests and positive PCR (*Leishmania* spp. and *L. chagasi*) were culled and necropsy fragments were analyzed. Parasites were detected in both methodologies (molecular and parasitological). These results confirmed the high specificity (56 dogs presented negative results in both methodologies) and high sensitivity (53/49) for PCR-*L. chagasi* in defining VL diagnosis.

The 53 dogs from both groups diagnosed with VL lived in areas not traditionally endemic for VL. After detecting the first case in a city, the "Surveillance Program for VL in São Paulo State" investigated the epidemiological history of each dog to determine whether it was an autochthonous infection (if the dog was born and raised in that city and/or went to an endemic area) or whether infection was acquired in another well-known endemic area. Additionally, the dogs living near the infected dog were also investigated. As diagnosis by PCR-*L. chagasi* was fast, it detected the autochthonous focus of canine VL in 14 of the 30 cities studied. The PCR-*L. chagasi* specificity was further confirmed by the 5 dogs with CL with negative PCR-*L. chagasi* that lived in 2 cities traditionally known as endemic for CL.

The detection of VL in these regions generated intense surveillance in neighboring cities. Mild signs were investigated by veterinarians and samples were sent to our laboratory. Negative results were shown in 56 dogs. The 43 dogs (77%) from group II had these characteristics, most of which lived in the 14 neighboring cities under investigation. The 13 culled dogs (29%) from group I with negative results for *Leishmania* probably had other diseases with symptoms similar to leishmaniasis.

In conclusion, PCR was effective both for differential diagnosis and genotyping. These findings are consistent with other studies (Ashford et al., 1995; Lainson and Shaw, 1998), in which the PCR inclusion in Leishmaniasis diagnosis can be a robust tool for early diagnosis and timely actions. These data emphasize the potential use of these approaches in surveillance and control programs for Leishmaniasis. Knowledge of the *Leishmania* species can also prevent culling of dogs without VL. *Leishmania* type is not determined by positive parasitological or serological tests; however, in an endemic area, it is sufficient for determination of culling the suspected animal (CVE, 2006). These detection methods are particularly relevant for developing countries where Leishmaniasis remains a serious public health problem.

Acknowledgment

This study was supported by grants from the FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil. Proc-04/13192-6).

References

- Al-Soud, W.A., Radstrom, P., 1998. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3748–3753.
- Armstrong, T.C., Patterson, J.L., 1994. Cultivation of *Leishmania braziliensis* in an economical serum-free medium containing human urine. *J. Parasitol.* 80, 1030–1032.
- Ashford, D.A., Bozza, M., Preite, M., Miranda, J.C., Shetlock, I., Eulálio, C., Lopes, U., Fernandes, O., Degraive, W., Barker, R.H., Badaró, R., David, J.R., 1995. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for detection of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, 251–255.
- Bernhal, F., Mary, C., Roze, M., Berenger, A., Escoffier, K., Lamouroux, D., Duman, S., 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 273–277.
- Camargo, E.P., 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypomastotes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 6, 93–100.
- Camargo-Neves, V.L.F., 2004. A leishmaniose visceral Americana no Estado de São Paulo (American visceral leishmaniasis in São Paulo State) (article in Portuguese). *Bol. Epidemiol. Paul.* 6. Available at: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>.
- Capelli, G., Baldelli, R., Ferraglio, E., Genchi, C., Gmüder, L., Gmüder, M., Maroli, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., Rossi, L., Ruggiero, M., 2004. Monitoring of canine leishmaniasis in northern Italy: an update from a scientific network. *Parasitologia* 146, 193–197.
- Capoli, E., Grimaldi, G., Momen, H., 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical taxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 296–312.
- CVE (Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (Epidemiological Surveillance Center of São Paulo State)), 2006. "II Informe técnico: Leishmaniose visceral Americana" (American visceral leishmaniasis. Technical manual) (in Portuguese). 48 pp. Available at: <http://www.cve.saude.sp.gov.br> (on line, accessed April 2006).
- Degraive, W., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopes, U., 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*—a mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89, 463–469.
- Fernandes, O., Bozza, M., Pascale, J.M., de Miranda, A.B., Lopes, U.G., Degraive, W.M., 1996. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania* (*Varia*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 279–284.
- Grimaldi, G., McMahon-Pratt, D., 1996. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 37–42.
- Grimaldi, G., Tesh, R.B., 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for the future research. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 230–250.

- 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.
- Lachaud, L., Marchegui-Hammami, S., Chabbert, E., Desreux, J., Dedet, J.P., Bastien, P., 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microb.* 40, 210–215.
- Lainson, R., Rangel, E.F., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil—a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, R. Janeiro* 100, 811–827.
- Lainson, R., Shaw, J.J., 1998. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: Collier, L., Balows, A., Sussman, M. (Eds.), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases*, 9th ed., vol. 5. Arnold, London, pp. 241–266.
- Le Pichoux, Y., Quaranta, J.F., Aufeuvre, J.P., Lelièvre, A., Marty, P., Suffia, L., Rousseau, D., Kubar, J., 1999. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1953–1957.
- Martur, J., Nasereddin, A., Niederwieser, I., Jaffe, C.L., Beck, H.P., Felger, I., 2003. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the minicircle sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3147–3153.
- Mauricio, I.L., Yeo, M., Baghaei, M., Doto, D., Pratlong, F., Zemanova, E., Dedet, J.P., Lukes, J., Miles, M.A., 2005. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int. J. Parasitol.* 36, 757–769.
- MSB (Ministério da Saúde do Brasil (Health Ministry of Brazil)), 2006. "Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral" (visceral leishmaniasis: surveillance and control. Technical manual) and "manual de controle da leishmaniose tegumentar americana" (American tegumentary: surveillance and control. Technical manual). Both articles in Portuguese. Available at <http://portal.saude.gov.br/portal/svs> (on line, accessed April 2006).
- Passos, V.M., Fernandes, O., Lacerda, P.A., Volpini, A.C., Gontijo, C.M., Degmve, W., Romanha, A.J., 1999. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the state of Minas Gerais, southeast Brazil. *Acta Trop.* 72, 251–258.
- Paula, A.A., Silva, A.V.M., Fernandes, O., Jansen, A.M., 2003. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. *J. Parasitol.* 89, 832–836.
- Ramirez, J.L., Guevara, P., 1987. The ribosomal gene spacer as a tool for the taxonomy of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 22, 177–183.
- Ravel, S., Cuny, G., Reynes, J., Veas, F., 1995. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Trop.* 59, 187–196.
- Reithinger, R., Quinnell, R.J., Alexander, B., Davies, C.R., 2002. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2352–2356.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J., 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65, 111–125.
- Rodriguez, N., Guzman, B., Rodas, A., Takiff, H., Bloom, B.R., Corvit, J., 1994. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2246–2252.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Schallig, H.D.F.H., Oskam, L., 2002. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop. Med. Int. Health.* 7, 641–651.
- Tibayrenc, M., 1997. Evolutionary genetics of *Trypanosoma*, *Leishmania* and other microorganisms. In: Hide, G., Mottram, J.C., Coombs, G.H., Holmes, P.H. (Eds.), *Trypanosomiasis and Leishmaniasis, Biology and Control*. CAB International, Wallingford, Oxford.
- Volpini, A.C., Passos, V.M., Oliveira, G.C., Romanha, A.J., 2003. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 90, 31–37.
- WHO, 2006. Available at: <http://www.who.int/diseases/leish/diseaseinfo.htm> (accessed April 2006).

ANEXO 4

----- Mensagem Original -----

De: EP ELS <ep@elsevier.com>

Para: pchioccola@ial.sp.gov.br <pchioccola@ial.sp.gov.br>

Assunto: EP-07-192R3: Final Decision

Data: 21/02/08 02:34

>

> Ms. No.: EP-07-192R3

> Title: Leishmania (V.) braziliensis: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis

> Corresponding Author: Dr Vera Lucia Pereira-Chioccola

> Authors: Aparecida HS Gomes, MS; Izabel M Armelin; Sueli Z Menon ;

>

> Dear Dr. Pereira-Chioccola,

>

> I am pleased to inform you that your manuscript referenced above has been accepted for publication. Your article has been forwarded to Elsevier's Production Department, and you should be receiving confirmation from them shortly.

>

> Many thanks for submitting your paper to Experimental Parasitology.

>

> Sincerely,

>

> Dr. John Horton

> Experimental Parasitology

> E-mail: ep@elsevier.com

>



Leishmania (V.) *braziliensis*: Detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis

Aparecida H.S. Gomes^a, Izabel M. Armelin^a, Sueli Z. Menon^a, Vera L. Pereira-Chioccola^{b,*}

^a Laboratório 1 – do Instituto Adolfo Lutz, Rua: Julio Hamer, 49, Sorocaba, SP, Brazil

^b Laboratório de Parasitologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr Arnaldo, 351-8 andar, CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 September 2007

Received in revised form 15 February 2008

Accepted 21 February 2008

Available online xxx

Index Descriptors and Abbreviations:

American cutaneous leishmaniasis

Leishmania (V.) *braziliensis*

PCR

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis presents similar clinical appearances, but differing prognosis in the course of infection. Ulcers caused by parasites of the subgenus *Vivax* are more aggressive than ulcers caused by parasites of the subgenus *Leishmania*. Another problem is distinguishing between true *Leishmania* infection and other skin diseases in endemic areas, where cutaneous lesions and a single positive Montenegro intradermal test are enough to submit patients to specific treatment for cutaneous leishmaniasis. This study evaluated the efficacy of PCR in detecting *Leishmania* in patients with cutaneous lesions. *Leishmania* (V.) *braziliensis* complex was determined by a primer pair from the multicopy spliced leader RNA. The results were compared to those of traditional methods. We analyzed biopsies of 109 patients with cutaneous lesions in the second most endemic region of São Paulo State, Brazil. Definitive diagnosis was established by clinical and "consensus laboratory criteria" (positive culture, stained tissue smears or PCR). Of 52 patients with cutaneous leishmaniasis, 96% had positive PCR, 69% positive parasitological tests and 100% positive Montenegro intradermal tests. Histopathological examination (only in 32 samples) were positive in 14 samples, suggestive in 14 and negative in 4 samples. All 57 patients with other etiologies had negative results in parasitological methods, PCR and histopathological examination (in 29 samples), but Montenegro intradermal tests were positive in 35%. PCR was highly sensitive and specific for *L. (V.) braziliensis* complex detection compared with other laboratory methods. Despite the specificity of the parasitological tests, the sensitivity was less than 70%. Montenegro intradermal reaction was highly sensitive, but with low specificity, only 65%. As suggestive results in histopathological examinations were shown in 14 samples, it was difficult to determine the true result. PCR applied to biopsies proved to be useful for differential diagnosis of cutaneous lesions of other etiologies in patients living in endemic areas. The advantages are most striking in clinical specimens with scarce amastigotes for which conventional methods have low sensitivity and should be considered for clinical and epidemiological patterns. On the other hand, both Montenegro intradermal test and parasitological methods are only modestly effective in cutaneous leishmaniasis diagnosis.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis are a group of chronic diseases caused by the genus *Leishmania*, transmitted from animals to humans by the bite of infected female sand flies. There is a broad spectrum of clinical forms, including those that affect skin, mucosa, or internal organs (Grimaldi and Tesh, 1993; Lainson and Shaw, 1998).

Leishmaniasis are prevalent on four continents and considered endemic in 88 countries, 72 of which are developing countries. The worldwide prevalence of the disease is estimated at 12 million cases, with 400,000 to 600,000 new cases per year for visceral forms and of 1–1.5 million for the cutaneous forms (WHO, 2007).

In Brazil, approximately 2500–5000 cases of visceral forms and 30,000–36,000 cases of cutaneous forms are reported per year. About 3–5% of all patients who develop cutaneous or mucocutaneous lesions have leishmaniasis (MSB, 2007). In São Paulo State, where the incidence is low, approximately 600 new cases are reported per year. Another considerable problem is the urbanization of the infection. In recent years, autochthonous cases have been described in rural areas. Presently, the incidence of periurban and urban cases has been increasing. Approximately 10% of the population that live in endemic areas is at risk for acquiring the infection (CVE, 2007). These data are sufficient for developing new control strategies such as facilities for diagnosis, treatment and population information.

Leishmania species in Latin-America belong to two taxonomic subgenera. The first is the subgenus *Leishmania*, composed of

* Corresponding author. Fax: +55 11 3068 2890.

E-mail address: pchioccola@luz.gov.br (V.L. Pereira-Chioccola).

Leishmania (*L.*) *mexicana* and *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*, responsible for localized or diffuse cutaneous disease; and *Leishmania* (*L.*) *infantum chagasi*, the cause of New World viscerotropic leishmaniasis. The second subgenus is *Viannia* cause of New World cutaneous leishmaniasis with cutaneous or mucocutaneous lesions, comprising *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, *Leishmania* (*V.*) *panamensis*, *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* and others (Rioux et al., 1990; Lainson and Shaw, 1998). In Brazil, cutaneous leishmaniasis is caused by at least six different *Leishmania* species (Shaw, 1994), but the vast majority of cutaneous lesions are caused by *L. (Viannia) braziliensis* (Grimaldi and Tesh, 1993; Lainson and Shaw, 1998).

The *Leishmania* species present with a similar clinical appearance, but with different prognosis during the course of the infection. The ulcers caused by parasites of the subgenus *Viannia* are more aggressive and can recur after treatment. The ulcers caused by parasites of subgenus *Leishmania* are less severe and more likely to cure spontaneously or after treatment (Grimaldi and Tesh, 1993; Pirmez et al., 1999; Ramos-e-Silva and Jacques, 2002). As some patients have small numbers of parasites within the lesions, it is difficult to establish a correct diagnosis. Another problem is to distinguish between true *Leishmania* infection and other skin diseases in endemic areas for cutaneous leishmaniasis, where cutaneous lesions and a single positive Montenegro intradermal test are sufficient to submit patients to specific treatment for leishmaniasis.

The traditional diagnosis of New World cutaneous leishmaniasis is performed using clinical and epidemiological features and through parasitological tests, by means of lesion biopsy of the and processing of the specimens for direct examination of smears after Giemsa staining, *in vitro* culture, histopathological techniques, and immunological methods (Grimaldi and Tesh, 1993; Ramos-e-Silva and Jacques, 2002). The different *Leishmania* species are not equally easy to culture. Contamination is a constant problem, and variations in efficacy among different growth medium formulations or even batches may be encountered. Likewise, the success of microscopic identification of amastigotes in stained preparations depends on the number of parasites present and/or the experience of the technician examining the slide.

The differentiation of *Leishmania* species is particularly important in regions such as São Paulo State where both visceral and cutaneous leishmaniasis are co-endemic. Recent findings showed *L. (L.) chagasi* dispersion in endemic areas for *L. (V.) braziliensis* (CVE, 2007). The accurate identification of *Leishmania* species has clinical and epidemiological benefits. It allows better orientation of medical treatment and follow-up, since clinical progress and parasite sensitivity to drugs may vary depending on the species of *Leishmania*. Detection of the particular *Leishmania* species from an endemic area is also essential to plan more suitable control activities and to understand the epidemiology of the disease. For this purpose several molecular methods have been developed, such as polymerase chain reaction (PCR); PCR followed by hybridization; and PCR–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) (Barker et al., 1991; Rodriguez et al., 1994; Harris et al., 1998; Schallig and Oskam, 2002; Marfurt et al., 2003; Volpini et al., 2003). Our group previously evaluated a PCR for detecting and genotyping *L. (L.) chagasi* and *L. (V.) braziliensis* in canine samples, which has been shown to be highly sensitive and specific (Gomes et al., 2007).

This study aimed to evaluate the efficacy of PCR in detecting cutaneous leishmaniasis in patients with cutaneous lesions, and its capacity to distinguish *L. (V.) braziliensis* from other *Leishmania* species avoiding “*in vitro*” cultivation. This PCR amplifies a fragment present in the multicopy spliced leader (RNA gene), having been shown to be highly sensitive and specific for *L. (V.) braziliensis* complex (Harris et al., 1998). The results were compared to those of traditional methods for the laboratory diagnosis of cutaneous

leishmaniasis. The patients studied attended public dermatology clinics in Sorocaba, an endemic region of São Paulo State. This region is considered the second most endemic region for cutaneous leishmaniasis in São Paulo State (about 80 new cases per year) (CVE, 2007), comprising 45 cities (small to medium size) with rural, periurban and urban localities.

2. Materials and methods

2.1. Patients and samples

From June 2005 to November 2006, cutaneous leishmaniasis diagnosis was performed in 109 patients with cutaneous lesions attending public dermatology clinics in 22 cities of Sorocaba region—São Paulo State. All patients analyzed in this study also lived in these cities and were selected considering epidemiological risk factors for cutaneous leishmaniasis, such as proximity of other infected patients as well as signs or symptoms of the disease. A complete dermatological examination was performed, and all patients presented cutaneous lesions suggestive of leishmaniasis. None of them had acquired the infection before or had been treated with drugs for leishmaniasis. The lesions were initially cleaned with antiseptics after the administration of a local anesthetic. The borders of the lesion were scraped or smears of material were obtained by punch biopsy of the lesions and immediately added to tubes containing 1–2 ml of a sterile 0.85% NaCl and 200 µg/ml gentamicin solution, and sent to the laboratory within 48 h, where they were immediately processed. Each sample was divided into three or four fragments, two of which were processed for parasitological tests (culture and microscopic examination), and a third for DNA extraction. In 71 specimens, the fourth fragment was used for histopathological examination. The Ethics Committee of Instituto Adolfo Lutz approved this study.

2.2. Traditional diagnosis

2.2.1. Montenegro intradermal test

This test was performed as previously described (Reed et al., 1986). The antigen suspension was supplied by Immunobiological Production and Research Center (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, PR, Br) – purchased by São Paulo State Health Secretariat and comprised a crude extract of *L. (L.) amazonensis* dissolved in phenol 0.005 g/ml, at a concentration of 40 µg/ml protein nitrogen. Intradermal injections were made with 0.1 ml of the antigen on the forearm of the patients. The reactions were measured after 48–72 h and were considered positive if indurations were more than 5 mm in diameter.

2.2.2. Parasitological methods

A portion of samples was plated onto a glass slide, fixed with methanol, and stained with Giemsa according to the WHO (WHO, 2007). The presence of amastigotes was observed microscopically (magnification 1000). The second portion was placed in culture. Tissue fragments were homogenized in a sterile plastic pestle and placed into 1.5 ml tubes. The samples were placed into two tubes containing two biphasic media, one of which was 30% rabbit defibrinated blood in Agar Potato Infusion (Ducrey) and the other 5–15% rabbit defibrinated blood in Agar Base pH 6.8 (BAB). Both media were supplemented with 2 ml Brain Heart Infusion medium (BHI), 5% sterile human urine and 200 µg/ml gentamicin (Armstrong and Patterson, 1994). The tubes were incubated at 25 °C for 10–15 days. The presence of promastigotes was carefully observed weekly by microscopy (Grimaldi and Tesh, 1993; WHO, 2007). Parasitological diagnosis was considered positive if parasites were present in at least one of the tests.

Please cite this article in press as: Gomes, A.H.S. et al., *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*: Detection by PCR in biopsies from patients with ... Exp. Parasitol. (2008), doi:10.1016/j.exppara.2008.02.014

2.2.3. Histopathological method

The fragments were embedded in paraffin and stained with hematoxylin–eosin (MSB, 2007; WHO, 2007). Results were considered positive when parasites were seen on microscopy. Pathological findings were considered only suggestive of the infection.

2.3. Molecular diagnosis

2.3.1. DNA extraction

DNA from clinical fragments was extracted as previously described (Gomes et al., 2007). The samples were dissolved in 10 mM Tris–HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 0.5% SDS; 0.01% N-laurylsarcosyl, 100 µg/ml proteinase K and briefly vortex mixed and incubated at 56 °C until complete cell lysis (5–24 h). DNA was extracted by phenol/chloroform/isoamylalcohol method and precipitated by isopropanol. After washing with 70% ethanol for 10 min at 1000g, the DNA pellet was dissolved in ultra pure water containing RNAase 20 µg/ml. DNA purity was determined by the ratio of OD at 260 and 280 nm (Sambrook et al., 1989).

2.3.2. Polymerase chain reaction

The amplifications and primer selection were carried out as previously described (Gomes et al., 2007). Each reaction was performed by the addition of 5 µl to each DNA template and 50 pmol for each primer in a final volume of 25 µl. The amplifications were carried out with a kit purchased from Amersham-Pharmacia-Biotech. The PCR beads were composed of 1.5 U of Taq DNA polymerase, 10 mM Tris–HCl, pH 9.0; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂; 200 mM of each dNTP and stabilizers as BSA. *L. (V.) braziliensis* complex was determined by a primer pair, which amplified a 146–149 bp sequence from the multicopy spliced leader (SL) RNA gene as target in a temperature annealing at 58 °C. One primer was LU-5A (sense) 5'-TTTATTGGTATGCGAACTTC-3' from a conserved SL intron in *Leishmania* spp. The other was LB-3C (antisense) 5'-CGT(C/G)CCGAACCCGTC-3' from a variable non-transcribed spacer, which is a specific region for *L. (V.) braziliensis* complex (Harris et al., 1998). To control the course of extraction and check for PCR inhibitors, a 140 bp fragment of the human β -globin gene was amplified in parallel. The primers used were β 1 (sense) 5'-ACCACCAACTTCATCCAGTTCACC-3' and β 2 (antisense) 5'-CTTCTGACACAAGTGTCTACTAGC-3' (Lee et al., 2001). Both reactions were run simultaneously with the same temperature protocol. *Leishmania* spp. was further determined in the negative PCR samples for *L. (V.) braziliensis* by a primer pair, which amplified a 120-bp sequence from the conserved region of *Leishmania* mini-circle kDNA as target in an annealing temperature of 55 °C (Passos et al., 1999). The samples were tested at least twice. Each amplification run contained two negative controls (ultra pure water and a negative DNA sample for *Leishmania*) and one positive control (DNA extract of *L. (V.) braziliensis* promastigotes, WHO reference strain–MHOM/BR/75/2903). After thermal cycles, PCR products were electrophoresed in 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. DNA fragments were made visible by UV illumination, and images were analyzed by a Syngene GeneSnap Imager, version 6.05.01. The sizes of fragments were based on comparison to a 100-bp ladder.

2.4. Data analysis

Clinical and laboratory criteria were used to establish the diagnosis. The samples were considered positive when cultures or stained tissue smears or PCR were positive. These values were used as the “consensus laboratory criteria” against which each individual diagnostic assay was compared. Sensitivity, specificity, positive (PPV) and negative (NPV) predictive values were determined considering the consensus results and were calculated as: (i)

sensitivity—ratio of true positives/true positives + false negatives; (ii) specificity—ratio of true negatives/true negatives + false positives; (iii) PPV—ratio of true positives/true positives + false negatives; and (iv) NPV—ratio of true negatives/true negatives + false positives.

3. Results

The central objective of this study was to investigate a PCR for distinguishing *L. (V.) braziliensis* in biopsies from other *Leishmania* species. We chose a previously described primer pair (Harris et al., 1998) based on the target *Leishmania* region. The SL RNA (mini-exon) gene repeat is present in the nuclear genome as a tandem array of approximately 200 copies. Each copy contains a transcribed conserved region and a non-transcribed variable region that differs among the *Leishmania* complexes in both sequence and size (Fernandes et al., 1994). The 5' primer was from the conserved region, and the 3' primer was specific to the variable region of *L. (V.) braziliensis* complex and a 146–149 bp fragment was amplified (Fig. 1). Harris et al. (1998) have shown high sensitivity and specificity of this primer pair tested in crude extracts of dermal scrapings prepared from ulcerated lesions of confirmed cutaneous leishmaniasis from patients in South and Central America. In addition, our group has previously evaluated these primers in canine samples, which has also been shown to be sensitive and specific (Gomes et al., 2007).

During the study-period (18 months), the 109 patients clinically suspected of having cutaneous leishmaniasis referred to the public dermatology clinics were diagnosed by clinical, epidemiological data and “consensus laboratory criteria”. The prevalence for cutaneous leishmaniasis in this study was 48% (52 cases). Parasites were identified by at least one of the methods employed (parasitological, PCR or histopathological) in 36 male (69%) and 16 female (31%). A detailed distribution of the clinical–epidemiological features of all patients is shown in Table 1. The majority of the positive patients were in the age groups 15–34 (27%) and 35–54 years (27%). The highest infection rate (50%) was seen in patients living in rural areas, and the lesions were recent (1–6 months) in 92% of the cases. Single lesions were seen in the majority of the cases and were mainly located on the arms/hands (36%) and legs/feet (31%). Multiple lesions appeared on two or more parts of the body in 23% of the cases.

Negative diagnosis was determined in the other 57 patients (52%), 32 males (56%) and 25 female (44%). Some differences were

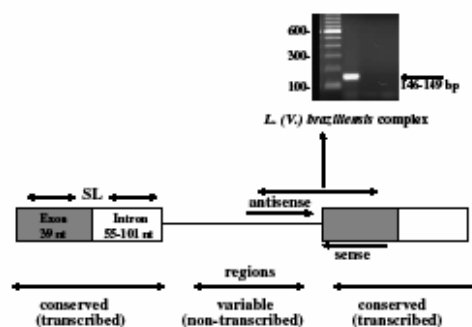


Fig. 1. Schematic diagram of the SL RNA gene and localization of the primers for *L. (V.) braziliensis* (Harris et al., 1998). The DNA of one sample indicated in gel at concentration of 85–90 ng was amplified and analyzed in electrophoresis in 2% agarose gel.

Please cite this article in press as: Gomes, A.H.S. et al., *Leishmania (V.) braziliensis*: Detection by PCR in biopsies from patients with ..., Exp. Parasitol. (2008), doi:10.1016/j.exppara.2008.02.014

Table 1
Distribution of clinical and epidemiological features from the 109 patients with cutaneous lesions

Patients features	Positive (%)	Negative (%)
	n = 52	n = 57
Sex		
Male	36 (69)	32 (56)
Female	16 (31)	25 (44)
Age (years)		
<15	8 (15)	8 (14)
15–34	14 (27)	13 (23)
35–54	14 (27)	18 (32)
55–64	9 (17)	10 (17)
≥65	7 (14)	8 (14)
Habitation		
Urban	11 (21)	21 (37)
Periurban	15 (29)	14 (25)
Rural	26 (50)	22 (38)
Duration (in months)		
1–6	48 (92)	37 (65)
7–12	4 (8)	16 (28)
≥12	0	4 (7)
Lesions		
Local		
Legs and feet	16 (31)	35 (62)
Arms and hands	19 (36)	8 (14)
Chest	3 (6)	3 (5)
Head	2 (4)	8 (14)
Multiple lesions	12 (23)	3 (5)

observed in this group. The majority of the patients were in the age group 35–54 years (32%). Patient distribution was similar for urban, periurban and rural areas (37, 25 and 38%, respectively), and in the majority (65%) of the cases, the lesions were also recent (1–6 months), but older lesions (after 7 months) also were seen (35%). Single lesions were observed in the majority of the cases and were mainly located on the legs and feet (62%).

The overall laboratory results, showing each individual diagnostic test for clinical samples of all patients are shown in Table 2. Samples from the 52 positive patients had the following results: 50 (96%) patients had positive results for PCR, whereas parasites were detected by at least one parasitological method in 69% (36 of 52) of the patients. Positive Montenegro intradermal test results were observed in all positive patients (100%). They had the following induration diameters (in mm) after 48–72 h of the inoculation: 16 patients had indurations up to 10 mm; 16, up to 15 mm; 18, up to 25 mm; and 2, up to 30 mm. Histopathological examination was possible in only 32 samples from positive patients and the results 14 were positive, 14 suggestive, and 4 negative. The 57 negative patients had the following results: all samples were negative in parasitological methods as well as PCR. Montenegro intradermal tests were positive in 20 (35%) patients with the following induration diameters: 11 patients had indurations up to 10 mm and 9 up to 15 mm. Histopathological examination could be performed on only 39 samples and all were negative. The control of the PCR inhibitors was a positive for human β -globin. Negative human β -

globin samples were re-purified and tested again. Thus, all 59 negative samples (2 from positive and 57 from negative patients) for *L. (V.) braziliensis* were positive for human β -globin. The second control was to determine whether two patients with negative PCR and positive parasitological methods; and the 20 patients positive for the Montenegro intradermal test and negative for the other tests might be infected with another *Leishmania* sub-group. Their samples were tested again by PCR to determine *Leishmania* ssp. No PCR product was observed in samples, confirming that all positive patients analyzed in this study were infected with only *L. (V.) braziliensis*.

Next, the laboratory results were evaluated to determine the sensitivities, specificities, PPV and NPV of each assay. Histopathological results were excluded from the statistical data because there were only 71 samples. PCR and parasitological methods were highly specific, having a specificity of 1.0 (100%). PCR had a sensitivity of 0.9615, whereas parasitological methods had a sensitivity of 0.6923. The Montenegro test was highly specific (1.0) for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis, but the specificity and positive predictive value was very low (0.6491 and 0.7222, respectively). The negative predictive value of PCR was 0.9661; parasitological methods, 0.7808; and Montenegro intradermal test, 1.0. Table 3 shows the results of each individual diagnostic test.

4. Discussion

In recent years, cutaneous leishmaniasis has been increasing worldwide, principally due the increasing population mobility. This contributes to *Leishmania* infection emergence in low or non-endemic areas (Gontijo and Carvalho, 2003; MSB, 2007). To prevent new cases in these areas, epidemiological strategies including rapid diagnosis, treatment and vector control must be implemented.

Typically, a diagnosis of cutaneous leishmaniasis is based on the clinical presentation of patients in geographical regions where the infection normally occurs and on epidemiological criteria, since certain disease manifestations have been associated with particular species or complexes. However, carcinomas or lesions caused by leprosy, syphilis, tuberculosis or *Paracoccidioides brasiliensis*, all of which are relatively common in Brazil, should be considered in differential diagnosis (Ramos-e-Silva and Jacques, 2002; Gontijo and Carvalho, 2003). Atypical infections have occurred such as visceral disease caused by *L. (V.) braziliensis* (Posada-Vergara et al., 2005). Thus, the identification of *Leishmania* species in clinical samples is necessary to confirm a suspected case of leishmaniasis. Consequently, molecular techniques have several advantages compared to traditional ones, such as the ability to detect parasites present in very low numbers and the ability to be performed with a broad range of clinical specimens (Barker et al., 1991; Laskay et al., 1995; Pirmez et al., 1999; Bensoussan et al., 2006).

In the last decade, significant progress has been made in molecular techniques for diagnosing infectious diseases. Several studies have demonstrated the usefulness of PCR on leishmaniasis (Barker et al., 1991; Laskay et al., 1995; Harris et al., 1998; Pirmez et al.,

Table 2
Comparison of traditional methods and PCR for *L. (V.) braziliensis* in patients with cutaneous lesions

Number of patients	Traditional methods										
	PCR		Parasitological		Montenegro intradermal test				Histopathological		
	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Until [10–15–25–30] (mm in diameter)	Neg	Pos	Suggestive	Np
Positive 52	2	50	16	36	0	52	[16–16–18–2]	4	14	14	20
Negative 57	57	0	57	0	37	20	[11–9–0–0]	39	0	0	18
Total 109	59	50	73	36	37	72		43	14	14	38

Cutaneous leishmaniasis diagnosis was determined based on consensus laboratorial criteria described in Materials and methods section. Neg, negative; Pos, positive; Np, test was not performed.

Please cite this article in press as: Gomes, A.H.S. et al., *Leishmania (V.) braziliensis*: Detection by PCR in biopsies from patients with ... Exp. Parasitol. (2008), doi:10.1016/j.exppara.2008.02.014

Table 3
Laboratory diagnosis for cutaneous leishmaniasis: sensitivity, specificity, positive and negative predictive values

Method	Number of samples		Sensitivity	Specificity	PPV ^a	NPV ^b
	Negative	Positive				
PCR	59	50	0.9615	1.0	1.0	0.9661
Parasitological tests	73	36	0.6923	1.0	1.0	0.7808
Montenegro intradermal test	37	72	1.0	0.6491	0.7222	1.0

^a Positive predictive value (PPV).

^b Negative predictive value (NPV), sensitivity and specificity for each assay were determined considering the consensus laboratory criteria described in Materials and methods section.

1999; Bensoussan et al., 2006; Gomes et al., 2007). Thus, PCR was chosen to determine *L. (V.) braziliensis* complex in clinical samples since other methodologies, such as hybridization, biochemical characterization and PCR-RFLP (Fernandes et al., 1994; Rodriguez et al., 1994; Schallig and Oskam, 2002; Volpini et al., 2003) are more time-consuming and costly methods.

The SL RNA gene is a good target due to the high number of copies in the genome and the presence of conserved and variable regions that differ among the *Leishmania* complexes (Fernandes et al., 1996). The primer pair used in this study was developed to amplify a 146–149 bp sequence from this gene in *L. (V.) braziliensis* complex, including *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana* (Harris et al., 1998). Previous studies have shown high sensitivity (0.01 to parasites) and specificity of this primer pair tested in crude extracts of dermal scrapings prepared from ulcerated lesions of confirmed cutaneous leishmaniasis from patients in South and Central America (Harris et al., 1998) and dogs in Brazil (Gomes et al., 2007). No PCR product was obtained from *L. (L.) chagasi* and *L. (L.) amazonensis* parasites, which are prevalent in several Brazilian regions, nor was a PCR product observed in *T. cruzi* epimastigotes, another kinetoplastid phylogenetically close to *Leishmania* spp. (Gomes et al., 2007) and widely distributed in Brazil. Since the vast majority of cases of cutaneous leishmaniasis in Brazil are caused by *L. (V.) braziliensis* (Grimaldi and Tesh, 1993; Ramos-e-Silva and Jacques, 2002), we selected this primer pair for diagnosis and genotyping the *L. (V.) braziliensis* complex.

Here, the efficacy of PCR was further determined comparing the results with those of traditional methods. As suggested by others, it is difficult to opt for a single “gold standard” method to determine the sensitivity and specificity of a method in cutaneous leishmaniasis diagnosis. In this respect, different assays could be evaluated. Consequently, assessment of assay performance was based on the assumption that, with sufficient coherence of clinical information, a patient was positive for cutaneous leishmaniasis when the infection was detected by at least two of the four diagnostic assays (Weigle et al., 2002). Supporting this approach, 48% of the patients with cutaneous lesions studied here were diagnosed as having cutaneous leishmaniasis. Parasites were demonstrated in a typical population target for cutaneous leishmaniasis that has been previously well described (Grimaldi and Tesh, 1993; Gontijo and Carvalho, 2003; Alvar et al., 2006). The majority were men (69%) of productive age, 15–54 (54%); living in rural area (50%); with recent lesions (92%); predominantly in arms/hands and legs/feet (67%). All patients included in this group were treated with a pentavalent antimonial drug (Grimaldi and Tesh, 1993; Gontijo and Carvalho, 2003).

The clinical and epidemiological features from the other 52% patients with negative results were quite different. They were evenly distributed in men (56%) and women (44%), also in productive age 15–54 (55%). They were equally distributed in urban (37%), periurban (25%) and rural (38%) areas. Despite the majority of the cases having single and recent lesions (65%), older lesions also were seen (35%), mainly 16 located on the legs and feet (62%). A clinical diagnosis was determined only in 15 patients (4 with car-

cinoma; 5 with infections caused by fungi; 2 with varicose ulcers; 1 with tuberculosis; and 3 with chronic processes without defined etiology). However, in the majority of the patients (42 cases), a definitive diagnosis was not obtained. The 20 patients with positive Montenegro intradermal test were treated with a pentavalent antimonial drug according to the recommendations of the “American tegumentary leishmaniasis: surveillance and control. Technical manual” (MSB, 2007) where a single positive Montenegro intradermal test is sufficient to submit patients to specific treatment. The other 22 patients were treated with antibiotic drugs. Despite the high specificity of parasitological methods, the sensitivity was less than 70%. These data are correlated with various drawbacks of these assays including bacterial contamination in cultures since lesions very often have secondary bacterial infections, as well as difficulty in seeing the parasites fixed on glass slides after Giemsa staining (Cuba et al., 1981; Pirmez et al., 1999; Weigle et al., 2002).

All positive patients had positive Montenegro intradermal tests, having indurations between 5 and 30 mm diameter. Different studies have also shown high sensitivity (Pirmez et al., 1999; Marques et al., 2001; Barros et al., 2005; Venazzi et al., 2006) and its importance for detecting old lesions, where it is difficult to view the parasite. However, it cannot distinguish active, inactive, or past infection (Pirmez et al., 1999). The greatest problem was the low specificity (65%). False positive results were seen in 20 patients (35%) with reactions up to 11 mm in diameter. Similar results have been reported before (Marques et al., 2001; Oliveira et al., 2005; Venazzi et al., 2006) and could be related to possible cross-reactions with other infections (Barros et al., 2005) or allergic response to phenol, the preservative present in the Montenegro reagent (Marzochi et al., 1998; Fagundes et al., 2007). Montenegro intradermal tests can detect past infections even after cure, making this test inadequate for follow-up on the evolution of the disease (Ramos-e-Silva and Jacques, 2002; Oliveira et al., 2005). None of the 109 patients studied here had been previously identified as having leishmaniasis. Although histopathological examinations could be performed on only 71 samples and these results were not used in the statistical analysis, it was difficult to determine the diagnosis by this method. Suggestive or negative histopathological results were present in 18 samples positive by other methods. Other studies have also described the low sensitivity of methods that require direct viewing of the parasites such as touch preparations or histopathology. In addition, experienced histopathologists are required due to the rarity of the parasites and their small size (Cuba et al., 1981; Pirmez et al., 1999; Weigle et al., 2002).

The sensitivity and specificity of the PCR for *L. (V.) braziliensis* complex were 96% and 100%, respectively. Only two patients with parasites detected by parasitological methods had negative PCR and, also had negative results for *Leishmania* spp. in a PCR using a primer pair, which amplified a 120-bp sequence from the conserved region of *Leishmania* (Passos et al., 1999). Thus, PCR applied to biopsies was the most sensitive and specific diagnostic assay compared to conventional methods, proving to be a good tool for the differential diagnosis of cutaneous lesions of other etiologies

Please cite this article in press as: Gomes, A.H.S. et al., *Leishmania (V.) braziliensis*: Detection by PCR in biopsies from patients with ..., Exp. Parasitol. (2008), doi:10.1016/j.exppara.2008.02.014

in patients living in endemic areas. The advantages are most striking in clinical specimens with scarce amastigotes for which conventional methods have low sensitivity and should be considered for clinical and epidemiological investigation. On the other hand, both Montenegro intradermal test and parasitological tests are modestly efficient for cutaneous leishmaniasis diagnosis. Inclusion of PCR in cutaneous leishmaniasis detection is recommended where there is: (i) inadequate leishmanial treatment when patients have a positive Montenegro intradermal test and other traditional methods are negative; (ii) in areas in which several *Leishmania* species requiring different management are endemic. These findings are consistent with other studies (Pirmez et al., 1999; Marques et al., 2001; Weigle et al., 2002; Venazzi et al., 2005; Gomes et al., 2007) and are particularly relevant for developing countries where cutaneous leishmaniasis remains a serious public health problem.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil, Proc-04/13192-6). We are grateful to Prof. Dra. Maria de Lourdes Peris Barbo (Serv. Anatomia Patológica – PUC – Centro de Ciências Médicas e Biológicas, Sorocaba) for histopathological tests; to the doctors and nurses from the Public Dermatologic Ambulatories of the cities: Alumínio, Angatuba, Campina do Monte Alegre, Capão Bonito, Cerquilho, Guapiara, Ibiúna, Iperó, Itaberá, Itapetininga, Itu, Mairinque, Piedade, Pilar do Sul, Ribeira, Salto de Pirapora, Sorocaba, São Roque, Tapiraí, Tietê, Votorantim, especially for Dra. Heloisa T.L.P. Raszi, Dra. Martha C. Figueiredo and Edna Penha Martins for clinical diagnosis and biopsy collection.

References

- Alvar, J., Yactayo, S., Bern, C., 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology* 22, 552–557.
- Armstrong, T.C., Patterson, J.L., 1984. Cultivation of *Leishmania braziliensis* in an economical serum-free medium containing human urine. *The Journal of Parasitology* 80, 1030–1032.
- Baker, D.C., Bruijn, M., Eresh, S., Smyth, A., 1991. Diagnosis of leishmaniasis using PCR on parasite DNA extracted from human biopsy samples, aspirates, sand flies and culture. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86, 73–74.
- Barros, M.B.I., Schubach, A., Francesconi-do-Valle, A.C., Gutierrez-Galhardo, M.C., Schubach, T.M.P., Conceição-Silva, F., Salgueiro, M.M., Mouta-Ribeiro, E., Reis, R.S., Madeira, M.F., Cuzzi, T., Quintella, L.P., Passos, J.P.S., Conceição, M.J., Marzochi, M.C.A., 2005. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. *Acta Tropica* 93, 41–47.
- Bensussan, E., Nasreddin, A., Jonas, F.S., Lionel, F., Jaffe, C.L., 2006. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 1435–1439.
- CVE—Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (Surveillance Epidemiological Center of São Paulo State). Site in Portuguese. Available from: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>. Accessed April 2007.
- Cuba, C.C., Marsden, P.D., Baer, A.C., Rocha, R., Sampaio, R.N., Putz-Anders, L., 1981. Parasitological and immunological diagnosis of American (mucocutaneous) leishmaniasis. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 15, 240–259.
- Fagundes, A., Marzochi, M.C., Perez, M., Schubach, A., Ferreira, A., Silva, J.P., Schubach, T., Marzochi, K.B., 2007. Skin reactivity to thimerosal and phenol-preserved Montenegro antigen in Brazil. *Acta Tropica* 101, 25–30.
- Fernandes, O., Bozza, M., Pascale, J.M., de Miranda, A.B., Lopes, U.G., Degraive, W.M., 1996. An oligonucleotide probe derived from rDNA minirepeats is specific for *Leishmania* (Vannia). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91, 279–284.
- Fernandes, O., Murthy, V.K., Kurath, U., Degraive, W.M., Campbell, D.A., 1994. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Molecular and Biochemical Parasitology* 66, 261–271.
- Gomes, A.H., Ferreira, I.M., Lima, M.L., Cunha, E.A., Garcia, A.S., Araújo, M.F., Pereira-Chioccola, V.L., 2007. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 144, 234–241.
- Gontijo, B., Carvalho, M.J.R., 2003. American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36, 71–80.
- Grimaldi, G., Tesh, R.B., 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for the future research. *Clinical Microbiology Reviews* 6, 230–250.
- Harris, E., Kropp, G., Belli, A., Rodriguez, B., Agabian, N., 1998. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 1989–1995.
- Lainson, R., Shaw, J.J., 1998. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: Collier, L., Balows, A., Sussman, M. (Eds.), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases*, ninth ed. Arnold, London, pp. 241–266, vol. 5.
- Laskey, T., Miled, T.J., Negesse, Y., Solbach, W., Rillinghoff, M., Frommel, D., 1995. Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89, 273–275.
- Lee, C.N., Cavanagh, H.M., Lo, S.T., Ng, C.S., 2001. Human papillomavirus infection in non-neoplastic uterine cervical disease in Hong Kong. *British Journal of Biomedical Science* 58, 85–91.
- Marfurt, J., Nasreddin, A., Niederwieser, I., Jaffe, C.L., Beck, H.P., Felger, I., 2003. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the minicodon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 3147–3153.
- Marques, M.J., Volpini, A.C., Genaro, O., Mayrink, W., Romanha, A.J., 2001. Simple form clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65, 902–906.
- Marzochi, K.B., Marzochi, M.A., Silva, A.F., Graciot, N., Duarte, R., Confort, E.M., Modabber, F., 1998. Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93, 205–212.
- MSB—Ministério da Saúde do Brasil (Health Ministry of Brazil), 2007. "Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana" (American tegumentary leishmaniasis: surveillance and control Technical manual). Article in Portuguese. [Online]. Available from: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude>>. Accessed April 2007.
- Oliveira, J.C.S., Novais, F.O., Oliveira, C.I., Cruz Junior, A.C., Campos, L.F., Rocha, A.V., Boaventura, V., Noronha, A., Costa, J.M.L., Baral, A., 2005. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta Tropica* 94, 55–59.
- Pirmez, C., da Silva Trajano, V., Pass-Oliveira Neto, M., da-Cruz, A.M., Gonçalves-da-Costa, S.C., Catanho, M., Degraive, W., Fernandes, O., 1999. Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 1819–1823.
- Posada-Vergara, M.P., Lindoso, J.A., Toledano, J.E., Pereira-Chioccola, V.L., Silva, M.V., Goto, H., 2005. Tegumentary leishmaniasis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome in 2 patients with AIDS. *The Journal of Infectious Diseases* 192, 1819–1822.
- Passos, V.M., Fernandes, O., Lacerda, P.A., Volpini, A.C., Gontijo, B.M., Degraive, W., Romanha, A.J., 1999. *Leishmania* (Vannia) *braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the state of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Tropica* 72, 251–258.
- Ramos-E-Silva, M., De Moura Castro Jacques, C., 2002. Leishmaniasis and other dermatoses in Brazil. *Clinics in Dermatology* 20, 122–134.
- Reed, S.C., Badali, R., Mansur, H., Carvalho, E.M., Lorenço, R., Lisboa, A., Teixeira, R., Johnson Jr., W.D., Jones, T.C., 1986. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35, 79–85.
- Rioux, J.A., Landt, G., Serres, E., Pradon, F., Bastien, P., Pedres, J., 1990. Taxonomy of *Leishmania* use of isozymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 65, 111–125.
- Rodriguez, N., Guzman, B., Rodas, A., Taliff, H., Bloom, B.R., Condit, J., 1994. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 2246–2252.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Book. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schallig, H.D.F.H., Otkam, L., 2002. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine and International Health* 7, 641–651.
- Shaw, J.J., 1994. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 89, 471–478.
- Venazzi, E.A., Roberto, A.C., Barbosa-Tessmann, I.P., Zanadoni, P.D., Lonadoni, M.V., Silveira, T.G., 2006. Polymerase chain reaction with lesion scraping for the diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101, 427–430.
- Volpini, A.C., Passos, V.M., Oliveira, G.C., Romanha, A.J., 2008. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (Vannia) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 90, 31–37.
- WHO—(World Health Organization), 2007. Available from: <<http://www.who.int/diseases/leish/diseases/leish>>. Accessed April 2007.
- Weigle, K.A., LaBrada, L.A., Lozano, C., Santrich, C., Barler, D.C., 2002. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (Vannia). *Journal of Clinical Microbiology* 40, 601–606.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)