

CÁSSIA REJANE BRITO LEAL

**USO DA ERIC-PCR PARA CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE  
*LEISHMANIA CHAGASI***

**CAMPO GRANDE  
2010**

CÁSSIA REJANE BRITO LEAL

**USO DA ERIC-PCR PARA CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE  
*LEISHMANIA CHAGASI***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha

**CAMPO GRANDE  
2010**

FOLHA DE APROVAÇÃO

CÁSSIA REJANE BRITO LEAL

**USO DA ERIC-PCR PARA CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE  
*LEISHMANIA CHAGASI***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor

Resultado: Aprovado

Campo Grande, MS, 30 de setembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha (Presidente)  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil  
Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Prof. Dra. Carla Cardozo Pinto de Arruda  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dra. Maria de Fátima Cepa Matos  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dra. Yvone Maia Brustoloni  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao Médico Veterinário **Dr. José Arthur Hage da Silva**, um grande mestre que me apresentou ao universo da pesquisa, um exemplo de competência, generosidade e gentileza.

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha**, pela orientação desse trabalho, pelo astral sempre positivo e por ser um importante referencial profissional.

As amigas-irmãs **Alda Maria Teixeira Ferreira** e **Alessandra Gutierrez de Oliveira**, não só pelo auxílio na realização desse trabalho, mas por justificarem, todos os dias, a importância de se ter amigos verdadeiros.

A equipe do Laboratório de Parasitologia Humana da UFMS: **Profa. Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval**, **Profa. Carla Cardozo Pinto de Arruda**, **Elisa Teruya Oshiro**, **Geucira Cristaldo**, **Zélia Soares da Silva** e **Jucelei de Moura Infran**, pela boa vontade e amizade, pela competência profissional e pelo indispensável apoio laboratorial.

A **Profa. Maria de Fátima Cepa Matos**, que de forma muito cordial proporcionou condições para execução das análises moleculares.

A **Verônica Jorge Babo Terra** pela amizade e pelas dicas de redação.

A **Dra. Elisa Cupolillo**, pela doação das amostras de referência e viabilização da realização de análises de isoenzimas.

Ao **Prof. Geraldo Alves Damasceno Junior**, pelo auxílio na análise dos dados e por toda disponibilidade demonstrada.

Ao **Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste**, pela oportunidade de capacitação.

Por fim, agradeço àqueles que fazem tudo valer à pena: À **minha família** e ao **Tinho**.

*"Educar é crescer. E crescer é viver.  
Educação é, assim, vida no sentido mais  
autêntico da palavra".  
(Anísio Teixeira)*

## RESUMO

**Leal CRB. Uso da ERIC-PCR para caracterização de amostras de *Leishmania chagasi*.** Campo Grande; 2010. [Tese – Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

A reação de polimerização em cadeia (PCR) usando *primers* para sequências repetitivas intergênicas de enterobactérias (ERIC) tem sido amplamente empregada em estudos de variabilidade genética em procariotos, e alguns eucariotos, mostrando-se eficiente na distinção das amostras. O objetivo deste trabalho foi avaliar, pela primeira vez, a utilidade da ERIC-PCR como ferramenta na determinação da similaridade entre amostras de *Leishmania* isoladas de pacientes com leishmaniose visceral no Mato Grosso do Sul. Foram estudadas nove amostras, previamente caracterizadas como *L. chagasi* pela técnica de isoenzimas, e duas amostras sem identificação prévia. O perfil genético foi comparado com cepas de referência de *L. chagasi*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. equatorensis*. As amostras foram submetidas a ciclos de PCR com os *primers* ERIC1R(3'-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-5') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'). O grau de similaridade foi avaliado usando-se o coeficiente de concordância simples por meio do programa Fitopac 1.6 (Unicamp). Análises dos resultados permitiram agrupar 10 amostras clínicas e a amostra referência de *L. chagasi*, com similaridade maior que 80%. Este grupo relaciona-se às amostras de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, com grau de similaridade menor que 50%, o que reforça o poder discriminatório da ERIC-PCR aplicada na amplificação de genoma de amostras de *Leishmania*. Os resultados encontrados podem fornecer maior conhecimento da epidemiologia molecular do parasito, e desta forma proporcionar melhor compreensão da diversidade das populações de *Leishmania* estudadas.

Palavras-chave: *Leishmania (Leishmania) chagasi*, ERIC-PCR, polimorfismo genético

## ABSTRACT

**Leal CRB. Use of ERIC-PCR for the characterization of *Leishmania chagasi* samples.** Campo Grande; 2010. [Tese – Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Polymerase chain reaction (PCR) with primers to enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences has been widely used in studies of genetic variability in prokaryotic and some eukaryotic organisms, revealing efficiency in distinguishing samples. The aim of this work was to evaluate, for the first time, the utility of ERIC-PCR as an auxiliary tool in the determination of the similarity between samples of *Leishmania* from patients with visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul state. Nine samples were used, previously characterized as *L. chagasi* using the isoenzyme analysis, and two samples of species not previously identified. The genetic profile was compared with samples of reference of *L. chagasi*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana* and *L. equatorensis*. The material was submitted to PCR cycles with the primers ERIC1R(3'-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-5') and ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'). The similarity rate was performed using the coefficient of simple matching through the program Fitopac 1,6 (Unicamp). Analyses of the results turned possible to gather the samples in a great group composed of 10 clinical samples and the sample of reference of *L. chagasi*, with similarity higher than 80%. This group is related to the reference samples of *L. amazonensis* and *L. braziliensis* with degree of similarity lesser than 50%, which confirms the discriminatory ability of ERIC-PCR applied in the amplification of genome of samples of *Leishmania*. These results can supply information for a better knowledge of the molecular epidemiology of the parasite, thus providing a better understanding of the diversity of the *Leishmania* populations.

Key-words: *Leishmania (Leishmania) chagasi*, ERIC-PCR, genetic polymorphism

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxonomia de <i>Leishmania</i> do Novo Mundo .....	6
Figura 2 - Ciclo evolutivo da <i>Leishmania sp</i> .....	8
Figura 3 - Reação de ERIC-PCR para amostras de referência de <i>Leishmania</i> .....	30
Figura 4 - Dendrograma demonstrando grau de similaridade para amostras de referência de <i>Leishmania</i> .....	31
Figura 5 - Reação de ERIC-PCR para amostras de <i>Leishmania</i> isoladas de portadores de leishmaniose visceral .....	32
Figura 6 - Dendrograma demonstrando grau de similaridade para amostras de <i>Leishmania</i> isoladas de portadores de leishmaniose visceral..	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Infusão de cérebro e coração
DVS	Divisão de vigilância em saúde
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
ERIC	Seqüências repetitivas intergênicas de enterobactérias
FAST	Fast agglutination screening test
IRUs	Unidades repetitivas intergênicas
LIBHIT	Infusão de fígado, cérebro, coração e triptose
LIT	Infusão de fígado e triptose
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGM	Fosfoglicomutase
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragments length polymorphism
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
SES	Secretaria de Estado de Saúde
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TM	Teste de Montenegro
TRALd	Teste rápido anticorpo <i>L. donovani</i>
WHO	World Health Organization

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
mg	miligrama
mL	mililitro
ng	nanograma
pb	pares de bases
rpm	rotações por minuto

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1 As leishmanioses .....	3
2.2 Classificação .....	5
2.3 Leishmaniose visceral .....	6
2.3.1 Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> .....	6
2.3.2 Aspectos clínicos da LV.....	8
2.3.3 Aspectos epidemiológicos da LV .....	9
2.4 Diagnóstico da LV .....	10
2.4.1 Métodos diretos .....	10
2.4.2 Diagnóstico imunológico .....	11
2.5 Análise da diversidade genética em <i>Leishmania</i> .....	13
2.5.1 Marcadores moleculares para estudo da <i>Leishmania</i> .....	14
2.5.1.1 Análise de isoenzimas .....	15
2.5.1.2 Reações baseadas na reação em cadeia pela polimerase (PCR) .....	16
2.6 Reação em cadeia da polimerase, baseada em sequências repetitivas intergênicas de enterobactérias (ERIC-PCR) .....	18
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	21
3.1 Objetivo geral .....	21
3.2 Objetivos específicos .....	21
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1 Amostras de <i>Leishmania</i> do Estado de Mato Grosso do Sul .....	22
4.2 Amostras de referência .....	23
4.3 Análise por isoenzimas .....	23
4.4 Extração do DNA .....	24
4.5 Quantificação de DNA genômico .....	25
4.6 ERIC-PCR .....	25
4.7 Análise dos padrões de bandas gerados pelo ERIC-PCR .....	26
<b>5 RESULTADOS</b> .....	27
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	39
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem um conjunto de manifestações clínicas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) que se encontram amplamente distribuídos em diversos países e regiões do mundo.

A Organização Mundial de Saúde estima que estas enfermidades acometam mais de 2 milhões de indivíduos por ano. Por esta razão seu controle é considerado prioritário, demandando investimentos em pesquisas sobre sua epidemiologia, aspectos clínicos, diagnóstico, tratamento e estudo de vetores e reservatórios.

As manifestações clínicas da infecção são muito variáveis podendo ocorrer desde formas subclínicas até um amplo espectro de manifestações envolvendo a pele e mucosas. Estas manifestações clínicas dependem da espécie de *Leishmania* e sua interação com o sistema imune do hospedeiro vertebrado.

O diagnóstico de rotina é realizado de acordo com as características clínicas e epidemiológicas, além do uso de testes sorológicos e demonstração da presença do parasito em tecidos ou em aspirado de medula óssea do paciente.

A existência de um grande número de espécies de *Leishmania*, além da semelhança estrutural entre elas, dificulta sua classificação com os métodos de diagnóstico baseados em morfologia. Dessa forma é necessário considerar os aspectos biológicos, bioquímicos e moleculares do parasito.

Muitos testes moleculares têm sido empregados com o propósito de identificar ou caracterizar geneticamente isolados de *Leishmania*. Esta motivação é justificada pelo conhecimento de que diferentes espécies podem causar manifestações semelhantes, podendo influenciar na evolução clínica do paciente ou mesmo na escolha do esquema terapêutico mais adequado. Além disso, deve-se considerar que, na atualidade, a facilidade de deslocamento e o movimento migratório de indivíduos entre regiões ou países, podem facilitar a entrada de espécies não presentes em uma área indene.

As técnicas moleculares empregadas visam estabelecer parâmetros genéticos que permitam agrupar isolados, caracterizá-los, demonstrar aspectos

epidemiológicos da doença e até mesmo auxiliar no entendimento dos aspectos clínicos relacionados à manifestação das leishmanioses.

Os métodos baseados em reações em cadeia da polimerase (PCR) têm sido muito úteis no diagnóstico da leishmaniose, porém a maioria consegue identificar apenas o gênero, quando a técnica é usada isoladamente. A combinação da PCR com enzimas de restrição ou sondas de DNA permite, com maior precisão, a identificação de espécies e cepas. Estas técnicas, no entanto, podem demandar maior tempo de execução, consumo de insumos e, conseqüentemente, maior custo.

Desde o ano de 1991, seqüências integrantes das unidades repetitivas intergênicas (IRUs), denominadas elementos ERIC (seqüências consenso intergênicas repetitivas de enterobactérias), têm sido estudadas em uma grande variedade de organismos. A detecção dessas seqüências, altamente conservadas, pela técnica de ERIC-PCR, tem sido uma ferramenta empregada no estudo, classificação e caracterização genética de amostras de bactérias, incluindo riquetsias, e também em análises de fungos e protozoários.

No Estado de Mato Grosso do Sul, a leishmaniose constitui uma enfermidade presente na maioria dos municípios. A leishmaniose visceral tem aumentado progressivamente na última década tornando-se motivo de preocupação pelo número de indivíduos afetados anualmente e pela gravidade clínica com que se apresenta.

Com o objetivo de contribuir para o estudo das leishmanioses, este trabalho teve o objetivo de avaliar a possibilidade do uso da técnica de ERIC-PCR na caracterização de isolados de *Leishmania chagasi* do Estado de Mato Grosso do Sul. Pretende-se com isso fornecer mais um instrumento que possa ser útil em pesquisas sobre este parasito, especialmente em estudos epidemiológicos e, possivelmente, também ser usado como método auxiliar ao diagnóstico de rotina.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 As leishmanioses

As leishmanioses são enfermidades não contagiosas, de caráter zoonótico, que compreendem um conjunto de manifestações clínicas de amplo espectro. São causadas por protozoários intracelulares da ordem Kinetoplastida, caracterizados por organismos flagelados, da família Tripanosomatidae, gênero *Leishmania* (Ross, 1903) (LAINSON, 1987, REY, 2008). Neste gênero destacam-se diversas espécies de importância médica, cujas manifestações são comumente designadas como leishmanioses (DUJARDIN, 2006), podendo apresentar-se sob duas formas principais: a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral ou calazar (LV).

As leishmanioses encontram-se entre as principais endemias consideradas prioritárias no mundo (BRASIL, 2006). Estão presentes em diversos continentes, com prevalência nas áreas de clima temperado a tropical, afetando populações em mais de 88 países (DESJEUX, 2004). Anualmente estima-se que ocorram 1,5 milhões de novos casos de leishmaniose (visceral e tegumentar), sendo que apenas 600 mil são oficialmente declarados. A mortalidade anual está em torno de 60 mil casos e, segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde, há uma população de 350 milhões de indivíduos expostos ao risco de adquirir a infecção em todo o mundo (WHO, 2010).

Estes parasitos são transmitidos ao homem e animais pela picada da fêmea de insetos vetores, genericamente denominados flebotomíneos. À despeito da existência de centenas de espécies de flebotomíneos nas Américas, apenas pouco mais de 10% do total podem ser classificadas como possíveis vetoras de *Leishmania* (LAINSON e RANGEL, 2003).

As manifestações clínicas da infecção são muito variáveis podendo ocorrer desde formas inaparentes ou subclínicas até um amplo espectro de manifestações envolvendo a pele e mucosas. Estas manifestações clínicas dependem da espécie de *Leishmania*, sua invasividade e interação com a resposta imune do hospedeiro

vertebrado, tropismo e patogenicidade da espécie (ASHFORD, 1996; REY, 2008, GOTO e PRIANTI, 2009). De acordo com estas características, e os respectivos vetores envolvidos, o agente etiológico pode ser classificado em espécies dermatrópicas e viscerotrópicas.

As espécies dermatrópicas do Novo Mundo são as causadoras da leishmaniose tegumentar americana (LTA), uma enfermidade com características típicas de zoonose silvestre. A presença do homem em áreas próximas às matas e florestas, devido a atividade ocupacional ou de lazer, favorece a aquisição dessa infecção. Todas as faixas etárias podem ser acometidas, porém a infecção é mais relatada em homens do que em mulheres (LAINSON e SHAW, 1987). Desde o ano de 2003 foi confirmada a presença autóctone da LTA em todas as unidades da federação (BRASIL, 2007).

A LTA é caracterizada pela presença de lesões na pele ou em mucosas, geralmente ocorrendo uma lesão primária no local de picada do vetor. Pode manifestar-se sob três formas: cutânea simples ou disseminada, com presença de lesões ulcerosas e indolores, únicas ou múltiplas; forma difusa, na qual ocorrem lesões nodulares; e também na forma mucocutânea. Esta última considerada grave, pela possibilidade de afetar principalmente regiões naso-faríngeas, podendo ter curso fatal, devido ao acometimento respiratório secundário (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; REITHINGER et al., 2007; GOTO e LINDOSO, 2010).

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas, somente em animais. No Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste. No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei* e *Lu. migonei* (BRASIL, 2007; RANGEL e LAINSON, 2009).

A forma visceral é considerada de maior gravidade devido à letalidade. A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, tem evolução crônica, sistêmica, caracterizada por febre de longa duração, perda de peso, anemia, hepatoesplenomegalia, dentre outras manifestações. O parasito invade e multiplica-se no sistema fagocítico-mononuclear do hospedeiro, por isso quando não tratada prontamente, pode evoluir para óbito (AWASTHI et al., 2004; CRUZ et al., 2006).

## 2.2 Classificação

Segundo Levine (1983) e Lainson (1987) o gênero *Leishmania* possui a seguinte posição sistemática:

<b>REINO</b>	PROTISTA HAECKEL, 1866
<b>SUB-REINO</b>	PROTOZOA Goldfuss, 1817
<b>FILO</b>	SARCOMASTIGOPHORA Honigberg e Balamuth, 1963
<b>SUB-FILO</b>	MASTIGOPHORA Deising, 1866
<b>CLASSE</b>	ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909
<b>ORDEM</b>	KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963, <i>emend.</i> VICKERMAN, 1976
<b>SUB-ORDEM</b>	TRYPANOSOMATINA Kent, 1880
<b>FAMÍLIA</b>	TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901, <i>emend.</i> Grobben, 1905
<b>GÊNERO</b>	<i>Leishmania</i> Ross, 1903

No Novo Mundo, são reconhecidas espécies de leishmânias, responsáveis pela doença no homem, pertencentes aos subgêneros *Viannia* (V.) e o subgênero *Leishmania* (L.) (LAINSON e SHAW, 1987; GRIMALDI JR et al., 1989; CUPOLILLO et al., 1994).

No esquema representado na figura 1, foi mantida a classificação proposta por Lainson e Shaw (1987) que consideram a distribuição das espécies de acordo com subgêneros e complexos. Alguns parâmetros foram usados para estabelecer

esta classificação, como o comportamento da amostra em cultivo artificial, a infectividade para *hamsters* e características da infecção no vetor.

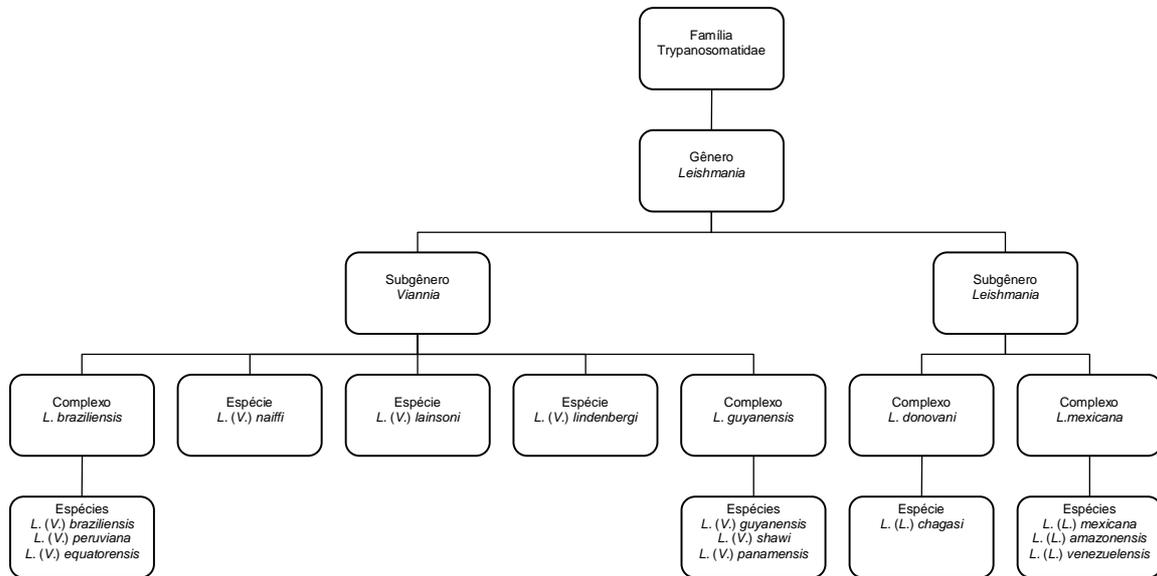


Figura 1: Taxonomia de *Leishmania* do Novo Mundo, adaptado da WHO (1990), Cupolillo et al., (1994) e Volpini (2003).

## 2.3 Leishmaniose visceral

### 2.3.1 Ciclo biológico da *Leishmania*

A LV tem como agente etiológico, no Brasil, a espécie *Leishmania chagasi*. Esta espécie tem sido relatada como sendo sinônimo de *L. infantum*, espécie causadora da enfermidade no Velho Mundo. Porém, apesar da semelhança entre estas duas espécies, está provado que não são idênticas (SHAW, 2006).

*L. chagasi* é transmitida, ao homem e outros vertebrados, por flebotomíneos hematófagos, da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, que constituem seus vetores e hospedeiros intermediários (KILLICK-KENDRICK, 1990, DEDET, 1993, GALATI, 2003).

No Brasil, duas principais espécies vetoras, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da leishmaniose visceral: *Lu. longipalpis* e *Lu.*

*cruzi*. A primeira é considerada a principal espécie transmissora da *L. chagasi*, mas *Lu. cruzi* também foi incriminada como vetora no Estado do Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2006). No país a distribuição geográfica de *Lu. longipalpis* é ampla e demonstra estar em expansão. Esta espécie é encontrada nas cinco regiões geográficas: Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste (AGUIAR e MEDEIROS, 2003; SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DO RIO GRANDE DO SUL, 2009). Os flebotomíneos são insetos conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros.

Os principais reservatórios do agente etiológico são representados pelo cão (*Canis familiaris*), animais silvestres como a raposa (*Cerdocyon* sp.) e marsupiais (*Didelphis* sp.), que agem como mantenedores do ciclo da doença. Espécies de roedores e primatas também constituem reservatórios de importância para o parasito (SILVEIRA et al., 1982; SHERLOCK et al., 1984; CORREDOR et al., 1989; SILVA et al., 2000; LIMA et al., 2003).

Durante seu ciclo biológico (Figura 2) estes microrganismos apresentam-se sob duas formas evolutivas: amastigotas em vertebrados (formas arredondadas e sem flagelo no exterior, que localizam-se no sistema fagocítico mononuclear) e promastigotas no tubo digestivo de invertebrados (formas alongadas, flageladas e infectantes). A transmissão ocorre quando fêmeas do flebotomíneo realizam repasto sanguíneo veiculando o agente de pessoa a pessoa, de animal a animal ou de animal a pessoa. A principal transmissão se faz a partir dos reservatórios animais, enquanto persistir o parasitismo na pele ou no sangue circulante (REY, 2008; TAYLOR et al., 2010).

Após o repasto sanguíneo as formas promastigotas são fagocitadas. O parasitismo resulta da incapacidade das células fagocíticas em eliminar o parasito devido à ação da própria *Leishmania* e de fatores imunológicos envolvidos no processo (SACKS e KAMHAWI, 2001; ROITT et al., 2002; STITES et al., 2004). No interior dos macrófagos, as formas promastigotas transformam-se em formas amastigotas, que, após sucessivas multiplicações, rompem a célula hospedeira dando continuidade ao ciclo de invasão celular. Durante um novo repasto sanguíneo, o vetor ingere as formas amastigotas livres e/ou macrófagos

infectados, que direcionam-se para o intestino, onde se transformam em promastigotas e se multiplicam. Estas formas serão inoculadas em um hospedeiro vertebrado quando o vetor realizar outro repasto sangüíneo (TAYLOR et al., 2010).

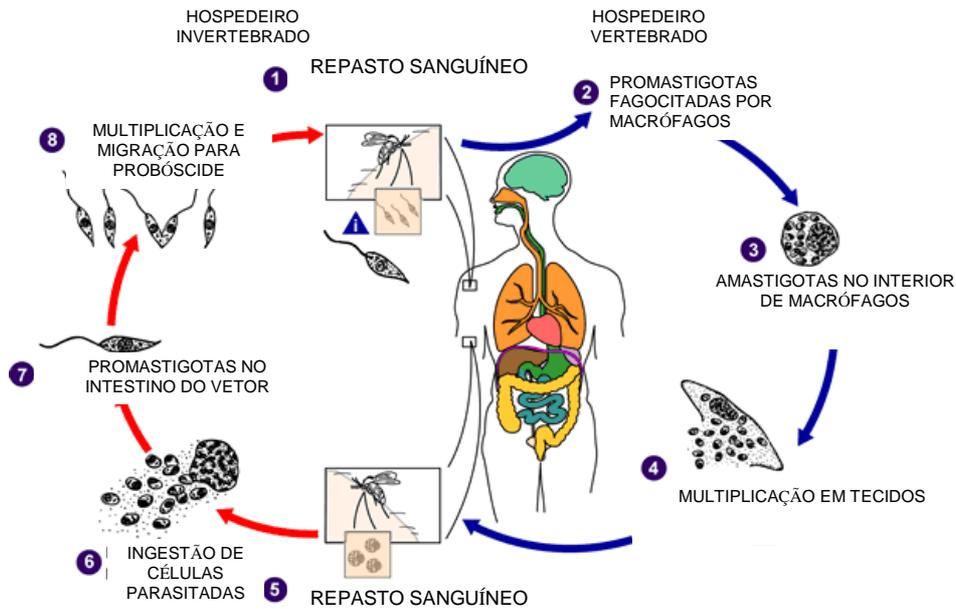


Figura 2: Ciclo evolutivo da *Leishmania* sp. (adaptado do endereço <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>)

### 2.3.2 Aspectos clínicos da leishmaniose visceral

As manifestações clínicas da LV refletem o equilíbrio entre a multiplicação dos parasitos nas células do sistema fagocítico mononuclear, a resposta imune do indivíduo e as alterações degenerativas resultantes desse processo. O período de incubação varia de 10 dias a 24 meses, sendo, em média, dois a quatro meses. A sintomatologia clássica da doença se apresenta com febre prolongada, astenia, adinamia, tosse, anorexia, perda de peso e caquexia, hepatoesplenomegalia acentuada e intensa palidez de pele e mucosas. Sinais clínicos como queda de cabelos, edema de membros inferiores e fenômenos hemorrágicos como gengivorragias, epistaxes, equimoses e petéquias estão presentes no quadro

clínico. Ocorre o retardamento da puberdade nos adolescentes e no crescimento das crianças e jovens. Os exames laboratoriais revelam pancitopenia, anemia acentuada, leucopenia, plaquetopenia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (GRIMALDI JR e TESH, 1993; CRUZ et al., 2006).

Observa-se que muitos indivíduos infectados apresentam forma inaparente ou oligossintomática da doença, e que o número de casos graves ou com ampla apresentação de sintomas é relativamente pequeno em relação ao de infectados (GAMA, 2001).

### **2.3.3 Aspectos epidemiológicos da LV**

As espécies de *Leishmania* de ocorrência no Mato Grosso do Sul, são representadas por: *L. braziliensis*, *L. amazonensis* (responsáveis pelas formas de apresentação cutânea, cutâneomucosa e difusa) e *L. chagasi* (causadora da forma visceral) (DORVAL, 2006; LIMA JUNIOR et al., 2009). A possibilidade de pacientes imunocompetentes desenvolverem a LV, após infecção por *L. amazonensis*, é alvo de investigação em Mato Grosso do Sul e representa mais um fator importante a se considerar no diagnóstico e tratamento dos pacientes (BOTELHO e NATAL, 2009).

A leishmaniose visceral é, primariamente, uma zoonose silvestre ou restrita a pequenas localidades rurais, sendo relatada em centros urbanos de médio porte, em área domiciliar ou peri-domiciliar. O maior fluxo de pessoas das áreas rurais para áreas urbanas, assim como a expansão na periferia de cidades de médio e grande porte, tem alterado significativamente as características de transmissibilidade da enfermidade, gerando o processo de urbanização da doença (ASHFORD, 2000; BRASIL, 2003).

No Brasil, a parasitose é diagnosticada em praticamente todos os Estados. As estatísticas oficiais mostram crescimento progressivo e registros ocasionais de surtos epidêmicos.

No Estado de Mato Grosso do Sul, o número de casos de LV tem progredido nos últimos anos em pequenos centros urbanos e até mesmo na

capital, Campo Grande. Em 1999 foram confirmados 44 casos no Estado, aumentando para 99 casos em 2001, 246 casos em 2004 e em 2005 houve a confirmação de 251 casos de LV com registro de 19 óbitos no ano. Em 2008 houve o maior índice de registro, com 283 casos, e no ano de 2010 já foram notificados 106 casos, até o mês de agosto (SINAN/DVS/SES/MS, 2010).

## **2.4 Diagnóstico da LV**

As diversas espécies de *Leishmania* e suas variabilidades, assim como os vetores, seus reservatórios e hospedeiros, presentes nos mais diversos ecossistemas, são fatores que influenciam no aparecimento das várias apresentações clínico-epidemiológicas da doença (CHANCE, 1979; LAINSON e SHAW, 1987).

A sensibilidade dos métodos de diagnóstico pode variar de acordo com a experiência de cada serviço, a qualidade do equipamento e dos insumos utilizados, o tempo de evolução das lesões, as formas clínicas e as diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas (BRASIL, 2007).

O diagnóstico das leishmanioses se baseia em métodos diretos para detecção das formas amastigotas, em amostras do hospedeiro vertebrado, ou nos métodos indiretos que refletem a resposta imune do hospedeiro contra o parasito. O diagnóstico definitivo requer a demonstração do parasito (WHO, 1990; GRIMALDI e TESH, 1993).

### **2.4.1 Métodos diretos**

A presença do parasito pode ser revelada pela pesquisa de amastigotas em esfregaços corados de amostras obtidas por punção da medula óssea. A microscopia direta tem baixo custo, mas sua eficácia é questionável devido aos diversos fatores que podem interferir na sensibilidade do método (HERWALDT, 1999). O curso da enfermidade, seu período de evolução, e até mesmo a habilidade técnica para obtenção das amostras, são fatores que podem levar a resultados falso-negativos. Esta técnica, isoladamente, também não possibilita a

identificação das espécies de *Leishmania* já que a morfologia das diversas espécies é muito semelhante (MARZOCHI et al., 2001; GENARO, 2003).

Amostras de aspirado medular também podem ser usadas para inoculação em *hamsters* (*Mesocricetus auratus*) ou em cultivos artificiais em meio bifásico NNN (Novy, McNeall, Nicolle) contendo fase líquida de Schneider's, LIT, LIBHIT ou BHI. Estes métodos são importantes para investigações epidemiológicas a fim de confirmar não só a presença do parasito, como também sua espécie, quando associado com outros métodos (GOTO e LINDOSO, 2010).

A inoculação em *hamster* é um procedimento de boa sensibilidade, mas a demora na reprodução da infecção pode inviabilizar este método como diagnóstico de rotina. O cultivo da *Leishmania* pode ser obtido pelo uso de meios artificiais. O meio de cultura NNN, com fase líquida, acrescido de soro fetal bovino e antibióticos, pode ter boa eficiência no diagnóstico. Em geral as culturas mostram-se positivas com sete a dez dias, mas um tempo superior a este pode ser necessário (GUERIN et al., 2002, BRASIL, 2006, Luz et al., 2009).

#### **2.4.2 Diagnóstico Imunológico**

O diagnóstico imunológico pode ser realizado com base na resposta humoral que o paciente exhibe durante o processo infeccioso.

Para o diagnóstico sorológico da LV a maioria dos testes utiliza antígenos de promastigotas obtidas em culturas. Neste caso há possibilidade de comprometimento da sensibilidade do teste, quando aplicado em áreas endêmicas. A especificidade também poderá ser afetada devido à possibilidade de reações cruzadas com outras espécies da família *Trypanosomatidae* (SUNDAR e RAI, 2002; VARGAS-DUARTE et al., 2009; ROMERO et al., 2009).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) utiliza como antígeno promastigotas fixadas em lâmina. Pode ser usada para pesquisa de IgM ou IgG. Em regiões de ocorrência da leishmaniose tegumentar americana (LTA) e doença de Chagas este teste pode não diferenciar as infecções (BRASIL, 2003).

O ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) é um teste rápido, de fácil execução e leitura. Tem boa sensibilidade e especificidade, permitindo o processamento de grande número de amostras simultaneamente. A leitura automatizada elimina erros de interpretação e torna a execução do teste mais simples (BERMAN, 1997; TAVORA et al., 2007). As possíveis reações cruzadas podem ser minimizadas pelo uso de antígenos purificados ou recombinantes (FLORES-CHAVEZ et al., 2010). No entanto há relato da ineficiência desse método na identificação de indivíduos portadores de LV assintomática, o que pode representar um problema aos estudos sorológicos em populações (MORENO et al., 2009).

O teste de aglutinação direta é um teste quantitativo, tem execução simples, porém requer longo período de incubação (18 horas), o que pode ser um fator limitante ao seu uso. Outro teste muito semelhante a este é o *fast agglutination-screening test* também chamado de teste de aglutinação rápida (FAST), cujo período de incubação é curto (3 horas). O FAST é um teste apenas qualitativo e seu desempenho associado à facilidade de execução o torna um bom candidato como teste de triagem. Outros testes incluem a imunocromatografia, que usa como antígeno a proteína recombinante rK39 (SILVA et al., 2005) .

Em 2008 um teste de imunocromatografia (DiaMed IT-LEISH®) foi validado para diagnóstico rápido da leishmaniose visceral, demonstrando alta sensibilidade e especificidade, que justificaram sua recomendação para diagnóstico em pacientes hospitalizados não portadores de co-infecção *Leishmania*-HIV (ASSIS et al., 2008).

O teste de imunocromatografia denominado Kalazar Detect® foi usado para estudo de população doadora de sangue, como método de triagem para leishmaniose, apresentando bom desempenho na identificação de indivíduos portadores (URIAS et al., 2009). Este teste atualmente encontra-se em avaliação pelo Ministério da Saúde no Brasil.

## 2.5 Análise da diversidade genética em *Leishmania*

Diversos estudos têm sido conduzidos com objetivo de determinar variabilidade genética presente em grupos, ou cepas, de *Leishmania* provenientes de diversas regiões fisiográficas (TIBAYRENC et al., 1993; CUPOLILLO et al., 1998, VOLPINI et al., 2004, PEREIRA, 2005, BRITO et al., 2009 ) .

As técnicas empregadas visam estabelecer parâmetros genéticos que permitam agrupar isolados, caracterizá-los, demonstrar aspectos epidemiológicos da doença e até mesmo auxiliar o entendimento dos aspectos clínicos relacionados à manifestação das leishmanioses.

O gênero *Leishmania* é descrito como sendo o gênero de protozoários que apresenta o maior número de espécies. O modo de reprodução do parasita pode ser um fator de influência na sua grande variabilidade genética (TIBAYRENC, 1998).

A predominância do modo de reprodução assexuada é a hipótese mais aceita, porém estudos revelam que é possível existir um mecanismo de recombinação genética, que não afeta o padrão de clonalidade das leishmânias (LAINSON e SHAW 1987, TIBAYRENC et al., 1990, TIBAYRENC et al., 1991, TIBAYRENC e AYALA, 2002). As mutações sofridas pelos parasitas devem ser determinantes na variabilidade existente em espécies (CIBULSKIS, 1988).

Recentemente estudos provaram que a hipótese de um mecanismo de reprodução sexuada é possível no gênero *Leishmania* (RAVEL et al., 2006; ROUGERON et al., 2010). Estes fatos tornam relevante a busca por métodos de diagnóstico que evidenciem esta diversidade populacional, uma vez que pode haver uma relação direta com a epidemiologia das leishmanioses.

### 2.5.1 Marcadores moleculares para estudo da *Leishmania*

O grande número de espécies patogênicas para o ser humano encontrado no gênero *Leishmania*, despertou o interesse de pesquisadores em buscar métodos de diagnóstico que possam identificar as diferentes espécies e avaliar a diversidade que possa existir intra-espécie (SHAW, 1994).

A inovação das técnicas moleculares tem gerado novas metodologias que são aplicadas aos estudos genéticos e da epidemiologia molecular, buscando a melhor caracterização do parasito. As características intrínsecas de um determinado organismo, que não são modificadas por fatores inerentes ao hospedeiro ou ao meio ambiente, tornam-se alvo de investigação por diversos métodos (REITHINGER e DUJARDIN, 2007).

Em relação ao estudo das leishmanioses, uma das dificuldades refere-se à grande variedade e diversidade clínica e epidemiológica verificada em diversos trabalhos realizados. Os métodos padrões de identificação e caracterização de cepas de *Leishmania* têm se baseado, fundamentalmente, em análise de isoenzimas, adicionalmente à aplicação de marcadores genéticos como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e RFLP (*Restriction Fragments Length Polimorphism*) para estudos filogenéticos (MACEDO et al., 1992; TIBAYRENC et al., 1993; CUPOLILLO et al., 1998).

O diagnóstico molecular permite a identificação das diversas espécies de *Leishmania* e pode muitas vezes revelar diferenças genéticas entre os isolados. Os métodos empregados na busca de marcadores taxonômicos de *Leishmania* são baseados em características genéticas, bioquímicas e imunológicas. Os métodos mais utilizados para identificar e caracterizar os isolados de *Leishmania* são: eletroforese de isoenzimas (KREUTZER et al., 1987; RIOUX et al., 1990; THOMAZ-SOCCOL et al., 1993; CUPOLILLO et al., 1994); reatividade de anticorpos monoclonais com antígenos espécie-específico do parasito (MCMAHON-PRATT et al., 1982; SHAW et al., 1989; GRIMALDI e MCMAHON-PRATT, 1996); análise de diferentes regiões do

genoma, por seqüenciamento associado a outras técnicas moleculares, como análise do polimorfismo gerado por enzimas de restrição – RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (BEVERLEY et al., 1987; GUEVARA et al., 1992; FERNANDES et al., 1994; MENDOZA-LEON et al., 1995); polimorfismo de regiões genômicas amplificadas aleatoriamente – RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (TIBAYRENC et al., 1993; GOMES et al., 1995) e PCR baseada em repetições de seqüências simples (SSP-PCR), também denominadas microsátélites (BECKMAN e WEBER, 1992).

#### **2.5.1.1 Análise de isoenzimas**

As isoenzimas são múltiplas formas moleculares de uma enzima resultante da presença de mais de um gene codificante. Em um organismo as isoenzimas desempenham a mesma atividade catalítica (MOSS, 1982).

Diferentes formas moleculares de uma enzima, detectadas através de eletroforese, são decorrentes do resultado de diferenças entre os genes que codificam tal enzima (BERGMANN e HATTEMER, 1998).

Essas enzimas podem ser fracionadas, devido as suas características moleculares (carga elétrica, peso molecular e estrutura quaternária), em um meio suporte (gel de amido, por exemplo) através do processo de eletroforese. O princípio do método fundamenta-se no conhecimento de que diferenças na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico são resultantes de diferenças ao nível de seqüências de DNA que codificam tais enzimas. Assim, se os padrões de bandas de dois organismos diferem, pode-se supor que estas diferenças possuam base genética e sejam herdáveis (MURPHY et al., 1990).

Após essa separação, as mesmas são identificadas por reações químicas baseadas em suas atividades catalíticas específicas. Após as reações, há o surgimento de produtos coloridos (bandas) que permitem identificar a sua posição no gel (ALFENAS, 1998).

Esta técnica foi uma das primeiras a ser empregada nos estudos do gênero *Leishmania*, sendo, ainda hoje, um método de referência para sua caracterização (CUPOLILLO et al., 1994; PRATLONG et al., 2009).

Muitos trabalhos confirmam que entre distintas espécies há um alto grau de diversidade enzimática, enquanto entre membros de uma mesma espécie este fenômeno é menor ou não percebido (ALJEBOORI e EVANS, 1980ab; KREUTZER et al., 1987, RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2006; GADISA et al., 2007).

A técnica apresenta boa sensibilidade e para evitar interpretações incorretas aumenta-se o número de enzimas estudadas, aumentando, portanto, o número de caracteres observados (ROMANHA, 1982).

No entanto, de acordo com as pressões exercidas pelo meio ambiente, podem ocorrer variações nos zimodemas e estas variações podem ser notadas em uma única cepa mantida em condições distintas (GRIMALDI JR et al., 1982).

### **2.5.1.2 Reações baseadas na reação em cadeia pela polimerase (PCR)**

As técnicas de PCR demonstram alta sensibilidade e especificidade sendo usadas com freqüência no diagnóstico da leishmaniose (PIRMEZ et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2003).

O *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) é uma técnica que se baseia no uso de *primers* oligonucleotídeos únicos, curtos e de seqüência aleatória para dirigir a reação de amplificação. É uma ferramenta que pode ser utilizada para o estudo de qualquer organismo permitindo fazer comparações diretas sobre diversidade genética e estrutura de populações entre organismos diferentes (TIBAYRENC, 1995).

Alguns pesquisadores têm empregado a técnica de RAPD para identificar polimorfismo genético inter e intra-específico em parasitos do gênero *Leishmania* em várias partes do mundo (POGUE et al., 1995; NOYES, 1998; PEREIRA, 2005). A técnica de RAPD foi utilizada com sucesso por Motazedian et al. (1996) para

distinguir as principais espécies de *Leishmania* do Velho Mundo (*L. tropica*, *L. major* e *L. infantum*).

Na técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) o polimorfismo é evidenciado pela fragmentação do DNA através de enzimas de restrição podendo ser potencializada quando associada à observação da hibridização destes fragmentos com sequências homólogas de DNA marcadas.

Comparando com a técnica de isoenzimas, este método tem a vantagem de permitir a análise de inúmeras (ou qualquer) região do genoma do organismo estudado. No entanto, a operacionalidade do método e a ausência de uma biblioteca genômica são fatores que podem limitar seu uso (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

O método PCR-RFLP revelou-se capaz de identificar as espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, sem a necessidade de realizar o seqüenciamento, porém, com igual segurança e eficácia (MARFURT et al., 2003; VOLPINI et al., 2004).

Medeiros (2002) realizou a técnica de PCR-RFLP em amostras de PCR positivas dos pacientes portadores de LT, atendidos em hospital de Ribeirão Preto-SP. A enzima Hae III foi usada para digestão dos produtos da PCR e comparação do perfil das amostras com *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Para os resultados compatíveis com *L. braziliensis*, observou a formação de duas bandas, de 80 e 40bp, fato esse que não ocorreu com os resultados compatíveis com *L. amazonensis*, quando o material não é digerido, havendo a permanência do fragmento de 120bp.

Entretanto, em outro estudo (GARCIA et al., 2005) realizado com 152 pacientes portadores de LT, o uso da técnica de RFLP identificou que 52,0% das amostras apresentaram a espécie *L. braziliensis*, 10,7% a espécie *L. amazonensis*, e em 15,3% a espécie não foi determinada. Esta falha na determinação da espécie foi atribuída ao fato de muitos pacientes serem portadores de infecções antigas. Este relato revela que esta técnica pode ter limitações, em algumas situações, na identificação dos isolados de *Leishmania*.

Em estudo realizado com amostras de *Leishmania* isoladas de pacientes no Estado do Pará, foi possível verificar que as isoenzimas 6PGDH, G6PD e PGM e os *primers* B1/B2 e S1629/S1630 distinguiram *L. lainsoni* das outras espécies do subgênero *Viannia*, sugerindo ser ótimo marcador para identificação desta espécie por PCR (IKUTA e ISHIKAWA, 2003).

Trabalho recente de Fraga et al. (2010) avaliou o sucesso da técnica de RFLP direcionada ao gene que codifica a proteína de choque térmico *hsp70*, em 43 isolados de *Leishmania*. Com base nos dados obtidos uma nova classificação do gênero foi proposta e constitui objeto de discussão entre especialistas (SCHONIAN et al., 2010).

Estes dados comprovam que a identificação precisa das espécies de *Leishmania*, muitas vezes requer a combinação de técnicas para sua correta classificação.

## **2.6 Reação em cadeia da polimerase, baseada em seqüências repetitivas intergênicas em enterobactérias (ERIC-PCR)**

A variabilidade genética presente em uma espécie de bactéria pode ser demonstrada pelo estudo dos fragmentos de DNA de tamanhos distintos, gerados a partir da amplificação de seqüências repetitivas existentes no genoma bacteriano, através da utilização de oligonucleotídeos específicos pela PCR (SAIKI et al., 1988).

Em 1991, Hulton et al. caracterizaram uma nova família de seqüências gênicas repetitivas em membros da família das enterobactérias, primeiramente em amostras de *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*. Estas seqüências integrantes das unidades repetitivas intergênicas (IRUs), denominadas elementos ERIC (seqüências repetitivas intergênicas de enterobactérias) compreendem um conjunto de seqüências conservadas distribuídas no genoma da maioria das espécies de eubactérias.

Estas IRUs têm sido descritas e identificadas como seqüências palindrômicas invertidas de aproximadamente 125pb, localizadas em regiões transcritas, intergênicas, de operons policistrônicos, ou regiões não traduzidas, em um número de cópias superior a 150 no genoma de bactérias Gram negativas (VERSALOVIC et al., 1991).

Esta técnica foi aplicada na diferenciação de cepas altamente relacionadas de *Bradyrhizobium japonicum*, bactérias Gram negativas do solo, as quais não haviam sido distinguidas por outros métodos (JUDD et al., 1993).

Na década de 90, pesquisas permitiram o uso da técnica para diferenciar espécies de *Pseudomonas* (LOUWS et al., 1994), *Bartonella* (RODRIGUEZ-BARRADAS et al., 1995), *Shigella* (LIU et al., 1995a), *Burkholderia* (LIU et al., 1995b), *Listeria* (JERSEK et al., 1996) e *Brucella* (TCHERNEVA, 1996).

Em 2001, Ferreira et al. demonstraram o uso da ERIC-PCR na avaliação de amostras da riquetsia *Anaplasma marginale* isoladas em diferentes regiões fisiográficas do Brasil. Neste estudo foi possível verificar que a técnica identificou as amostras, diferenciando-as da espécie *Anaplasma centrale*, e também possibilitou confirmar a diversidade presente nas amostras originárias dos Estados do Paraná e Pernambuco.

Esta técnica teve seu uso difundido e ampliado tanto no estudo de organismos procariotos quanto de eucariotos.

Madruga et al. (2002) demonstraram pela primeira vez a possibilidade de uso dessa técnica na caracterização de um protozoário parasita. Os autores identificaram a diversidade genética presente em amostras do protozoário *Babesia bigemina* isoladas em cinco Estados do Brasil.

Em amostras de *Fusarium solani* obtidas de pacientes portadores de ceratite micótica, a técnica de ERIC-PCR revelou maior poder discriminatório para diferenciação das amostras quando comparada a técnica de RFLP (GODOY et al., 2004). Os autores também verificaram a existência de alta heterogeneidade genômica das cepas estudadas.

O polimorfismo genético de isolados de *Trypanosoma vivax* foi observado pelo uso da técnica de ERIC-PCR em amostras do pantanal Matogrossense.

Neste estudo foi verificada a pouca variabilidade genética dos isolados. Foi o primeiro relato realizado em amostras do gênero *Trypanosoma* com esta técnica (OSÓRIO, 2002).

Zulkifli et al. (2009) demonstraram o emprego da ERIC-PCR para avaliar a variabilidade genética de amostras de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de berbigão. Os autores afirmaram que a alta diversidade encontrada poderia ser atribuída a variedade de fontes de contaminação. Fato semelhante ocorreu em trabalho realizado por Yuan et al. (2010) que empregaram a técnica de ERIC-PCR na avaliação de *E. coli* obtidas do ar de unidades criadoras de suínos. Os autores verificaram que foi possível identificar a origem da fonte de contaminação devido a grande especificidade e sensibilidade demonstrada pela técnica.

Estes estudos revelam que esta técnica tem potencial para uso na caracterização de grande variedade de organismos, sejam procariontes ou eucariontes, permitindo identificar variações decorrentes de agrupamentos em gêneros, espécies ou, até mesmo, intraespécie. Esta variabilidade genética pode revelar características relacionadas a regiões geográficas, hospedeiros, vetores ou mesmo a apresentação clínica de uma enfermidade.

Dessa forma, devido à complexidade apresentada pelo gênero *Leishmania* e às dificuldades de identificação das espécies por métodos convencionais, este trabalho teve como proposta avaliar o uso da ERIC-PCR como uma ferramenta auxiliar ao diagnóstico das leishmanioses, contribuindo para melhor conhecimento da diversidade das populações de *L. chagasi* presentes no Estado de Mato Grosso do Sul.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o uso da técnica de PCR, baseada em sequências repetitivas intergênicas de enterobactérias, para caracterização de parasitos do gênero *Leishmania*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Verificar a existência de sequências repetitivas intergênicas (ERIC) em amostras de *Leishmania* spp.
- b) Demonstrar a capacidade discriminatória da técnica de ERIC-PCR na identificação de amostras de *Leishmania chagasi*.
- c) Avaliar o grau de similaridade de isolados de *L. chagasi*, provenientes do Estado do Mato Grosso do Sul, através da técnica de ERIC-PCR.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostras de *Leishmania* do Estado de Mato Grosso do Sul

Foram utilizados isolados de *Leishmania* obtidos a partir de casos humanos de LV. Os isolados usados neste estudo foram provenientes do banco de amostras do Laboratório de Parasitologia Humana (DPA-CCBS) da UFMS (Anexo B), gentilmente cedidos pela Dra. Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval.

Estas amostras foram obtidas a partir do cultivo dos parasitos provenientes de aspirado de medula óssea de indivíduos portadores de LV em Mato Grosso do Sul.

O diagnóstico direto foi executado em material obtido por punção medular. Formas amastigotas foram pesquisadas em esfregaços delgados, fixados e corados com Giemsa. Parte do aspirado medular foi semeado em meio de cultivo bifásico NNN-Schneider® (Novy, McNeall, Nicolle) acrescido de 20% de soro fetal bovino e antibióticos (200 UI de penicilina e 200 µg de estreptomicina). Após o crescimento dos parasitos em cultura, o sobrenadante foi centrifugado a 3800 x g, por 15 minutos, a 4°C, lavado duas vezes em salina tamponada estéril e acondicionado em criotubos contendo solução de congelamento (Schneider®, glicerol e soro fetal bovino). As amostras foram conservadas em botijões contendo nitrogênio líquido.

No momento de realização das análises, as amostras foram descongeladas em banho Maria a 37°C e posteriormente semeadas em meio de cultura bifásico NNN-Schneider®, suplementado com 20% de soro fetal bovino e acrescido de antibióticos (200 UI de penicilina e 200 µg de estreptomicina).

Os frascos de cultura foram mantidos em incubadora de BOD, com temperatura ajustada para 25°C, até visualização das formas promastigotas. Foram efetuados repiques das amostras, nas mesmas condições anteriores, para obtenção dos parasitos em fase de crescimento logarítmica (*log*).

Do total de amostras usadas neste estudo, nove foram submetidas à

caracterização da espécie por análise de isoenzimas e duas não foram submetidas a esta caracterização.

#### **4.2 Amostras de referência**

As amostras foram comparadas com cepas de referência da Organização Mundial de Saúde, provenientes da coleção do Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose do IOC-FIOCRUZ e gentilmente cedidas pela Dra. Elisa Cupolillo.

Para comparação com isolados do Estado de Mato Grosso do Sul foram usadas as seguintes amostras de referência: *L. chagasi* (L579 MHOM/BR/1974/PP75); *L. braziliensis* (L566 MHOM/BR/1974/M2903); *L. mexicana* (L561 MHOM/BZ/1982/BEL21) e *L. equatorensis* (L888 MCHO/EC/1982/LSP1). Também foi usada uma amostra de *L. amazonensis* (MHOM/BR/2001/JLM) isolada no município de Bela Vista, Mato Grosso do Sul.

#### **4.3 Análise por isoenzimas**

A identificação da espécie de *Leishmania* de nove isolados, provenientes de pacientes portadores de LV, foi realizada pela técnica de eletroforese de enzimas em gel de agarose, utilizando seis enzimas (G6PDH: glicose 6 fosfato desidrogenase/1.1.1.49; IDH-NADP: isocitrato desidrogenase/1.1.1.42; MPI: manose fosfato isomerase/5.3.1.8; MDH: malato desidrogenase/1.1.1.37, 6PGDH: 6 fosfogluconato desidrogenase/1.1.1.43, ACON: aconitase/4.2.1.3).

A preparação das amostras para a caracterização isoenzimática e as condições de eletroforese e revelação foram processadas de acordo com metodologia descrita por Cupolillo et al. (2004).

As amostras destinadas à caracterização isoenzimática foram obtidas a partir de formas promastigotas cultivadas em meio NNN-Schneider<sup>®</sup>, em fase de crescimento exponencial. As promastigotas foram centrifugadas a 1000 x g, durante 10 minutos, à temperatura de 4°C. O sedimento foi lavado três vezes em

salina fosfatada tamponada (PBS), pH 7,2, e na última etapa foi ressuspenso em tampão Tris-EDTA (14 partes de água destilada:1 parte de 0.1 M Tris/Ácido maléico/EDTA/MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4). A suspensão foi submetida a ciclos de congelamento/descongelamento, intercalando nitrogênio líquido e banho Maria 37°C. O lisado celular foi centrifugado a 8000 x g, por 20 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi reservado para eletroforese. A concentração protéica foi determinada e ajustada para 1mg/mL de proteína.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,5% (diluído em tampão fosfato pH 8,0 ou tampão maléico pH 7,4) no qual se aplicou 10µL das amostras diluídas com solução de azul de bromofenol, para melhor visualização da corrida. Utilizou-se o aparelho Multiphor II System, mantido em temperatura constante de 10 °C. A corrida foi realizada usando os mesmos tampões de preparação do gel e a voltagem do aparelho foi ajustada a 40v para o tampão fosfato e 60v para o tampão maléico. Ao término da corrida o gel foi removido da cuba e incubado a 37 °C imerso em solução contendo substrato específico para cada enzima. A parada da reação foi realizada por solução de ácido acético a 5%. O gel foi avaliado por inspeção visual das bandas reveladas e identificação dos eletromorfos em comparação com amostras de referência.

#### **4.4 Extração do DNA**

As amostras em fase *log* foram distribuídas em tubos, adicionou-se tampão de lavagem TE (Tris HCl 0,2M; EDTA 0,1M) com pH 8,0 e centrifugou-se a 4800 x g, por 15 minutos, a 4°C. Este procedimento foi repetido com o sedimento por três vezes. Na última etapa, o sedimento foi acondicionado em tubo de criopreservação e congelado a -20°C até o momento da extração do DNA.

A extração do DNA genômico foi executada com o Kit DNA da Promega<sup>®</sup>, Wizard Genomic (Catálogo A1125) segundo as instruções do fabricante. Inicialmente, 300µL da massa parasitária foram homogeneizados com tampão para lise de células e, após incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, foi realizada centrifugação a 15.600 x g por 20 segundos. Ao sedimento foi

adicionado 300µL de tampão de lise de núcleo e a seguir 100µL de solução de precipitação de proteína. Após agitação em vortex por 20 segundos foi realizada centrifugação a 15.600 x g por um minuto e a precipitação do DNA, a partir do sobrenadante, foi realizada com isopropanol. Após centrifugação para remoção do isopropanol, adicionou-se etanol (70%), o qual foi removido por centrifugação e a seguir 100µL da solução para hidratação do DNA foi adicionada. A hidratação foi realizada a 4°C por 24 horas. O DNA foi mantido congelado a -20°C até o momento de realização da PCR.

#### **4.5 Quantificação de DNA genômico**

As quantificações de DNA, das cepas referência e dos isolados, foram determinadas pela medida de absorbância a 260nm em espectrofotômetro Nanodrop.

#### **4.6 ERIC-PCR**

A reação de PCR foi realizada com os *primers* ERIC1R(3'-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-5') e ERIC2(5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), à concentração de 50pmol, como descrito por Versalovic (1991). As reações de amplificação foram executadas para o volume final de 25 µL, com o GoTaq Green padrão Mix<sup>®</sup> (Promega, catálogo M712B). As reações foram incubadas a 95°C por 1 minuto e em seguida 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos, usando o termociclador BIOER modelo XP Cycler.

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com tampão TBE (tris base, ácido bórico e EDTA). O aparelho foi ajustado para 100v e 400mA. A análise foi realizada pela coloração do gel com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualização em transiluminador com lâmpada ultravioleta.

#### **4.7 Análise dos padrões de bandas gerados pela ERIC-PCR**

O tamanho das bandas geradas após a eletroforese dos produtos de ERIC-PCR foi determinado por comparação direta com um marcador de massa molecular de 100pb (Promega, catálogo G2101). O gel foi analisado por inspeção visual, considerando todas as bandas visíveis. Não se considerou a variação de intensidade e formato das bandas. O perfil de bandas visíveis foi convertido para uma matriz binária na qual foram atribuídos os seguintes valores: 0=ausência e 1=presença. O grau de similaridade foi determinado pelo coeficiente de concordância simples e os respectivos dendrogramas foram gerados com auxílio do programa Fitopac 1.6, versão 2006 (UNICAMP).

## 5 RESULTADOS

A identificação da espécie das amostras provenientes de pacientes portadores de LV (amostras 1 a 9), foi obtida por meio da comparação dos perfis isoenzimáticos das amostras com cepas de referência. Para cada enzima, as bandas com mobilidade eletroforética idênticas foram consideradas como sendo o mesmo eletromorfo. Dentre os eletromorfos encontrados, alguns são considerados diagnósticos, ou seja, caracterizam determinados grupos ou zimodemas. Com base neste padrão as amostras foram caracterizadas como pertencentes à espécie *L. chagasi* (Tabela 1).

Tabela 1 - Identificação de amostras de *Leishmania*, isoladas no Estado de Mato Grosso do Sul, pela técnica de análise de isoenzimas.

Nº	Identificação	Procedência	Forma clínica	Espécie
01	MHOM/BR/2005/JCS	Bela Vista	LV	<i>L. chagasi</i>
02	MHOM/BR/2005/AS	Campo Grande	LV	<i>L. chagasi</i>
03	MHOM/BR/2005/ACN	Campo Grande	LV	<i>L. chagasi</i>
04	MHOM/BR/2005/JLPC	Campo Grande	LV	<i>L. chagasi</i>
05	MHOM/BR/2005/ASC	Campo Grande	LV	<i>L. chagasi</i>
06	MHOM/BR/2005/LPC	Campo Grande	LV	<i>L. chagasi</i>
07	MHOM/BR/2004/AISL	Campo Grande	LV	<i>L. chagasi</i>
08	MHOM/BR/2005/LO	Campo Grande	LV	<i>L. chagasi</i>
09	MHOM/BR/2004/EJSB	Campo Grande	LV	<i>L. chagasi</i>

LV – Leishmaniose visceral

As condições de amplificação para amostras de *Leishmania* com os *primers* ERIC demonstraram ser satisfatórias, gerando padrão de bandas adequado quanto ao número, intensidade e tamanho. A concentração de DNA usada para obtenção da reação variou entre 25 a 30 ng. Os produtos de amplificação apresentaram tamanhos que variaram entre 100 a 1700 pb (Figuras 3 e 5). Considerando a detecção de bandas distintas, é possível verificar que a amplificação com estes *primers* gerou 19 bandas nas amostras dos pacientes e 20 bandas nas amostras de referência. A intensidade do sinal da banda não foi considerada um padrão relevante para esta avaliação.

O número de bandas, obtidas em cada amostra, variou de 4 a 9 para as de referência (Figura 3) e entre 5 a 12 para as dos pacientes (Figura 5).

Observando o dendrograma representado na figura 4, é possível constatar que a técnica de ERIC-PCR foi capaz de agrupar as amostras de acordo com o subgênero e respectivos complexos aos quais pertencem. As amostras de *L. (V) braziliensis* e *L.(V) equatorensis* foram agrupadas com índice de concordância de 81%, enquanto *L.(L) amazonensis* e *L.(L) mexicana* (ambas do complexo *L. mexicana*) agruparam-se com similaridade de 72% e uniram-se a espécie *L.(L) chagasi* com índice de 63%.

A técnica de ERIC-PCR conseguiu identificar todas as amostras clínicas testadas, inclusive as amostras 10 e 11, como pertencentes a espécie *L. chagasi*. O poder discriminatório foi adequado, confirmando o resultado prévio de identificação das nove amostras, também classificadas pela análise de isoenzimas como pertencentes a esta espécie.

Análises dos resultados obtidos permitiram agrupar as amostras dos pacientes em um grande grupo composto de 10 amostras clínicas e a amostra referência de *L. chagasi*, com similaridade maior que 85% (Figura 6). Mesmo considerando que a amostra número 1 teve menor índice de similaridade no agrupamento (73%), pode-se afirmar com segurança que esta amostra pertence a espécie *L. chagasi*. Estas amostras (1 a 11) estão relacionadas às amostras de referência de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* com grau de similaridade menor que

50%, o que reforça o poder discriminatório de ERIC-PCR aplicado na amplificação de genoma de amostras de *Leishmania*. O agrupamento da amostra de referência de *L. chagasi* em relação a *L. amazonensis* e *L. braziliensis* ocorreu com grau de similaridade menor que 48% (Figura 6).

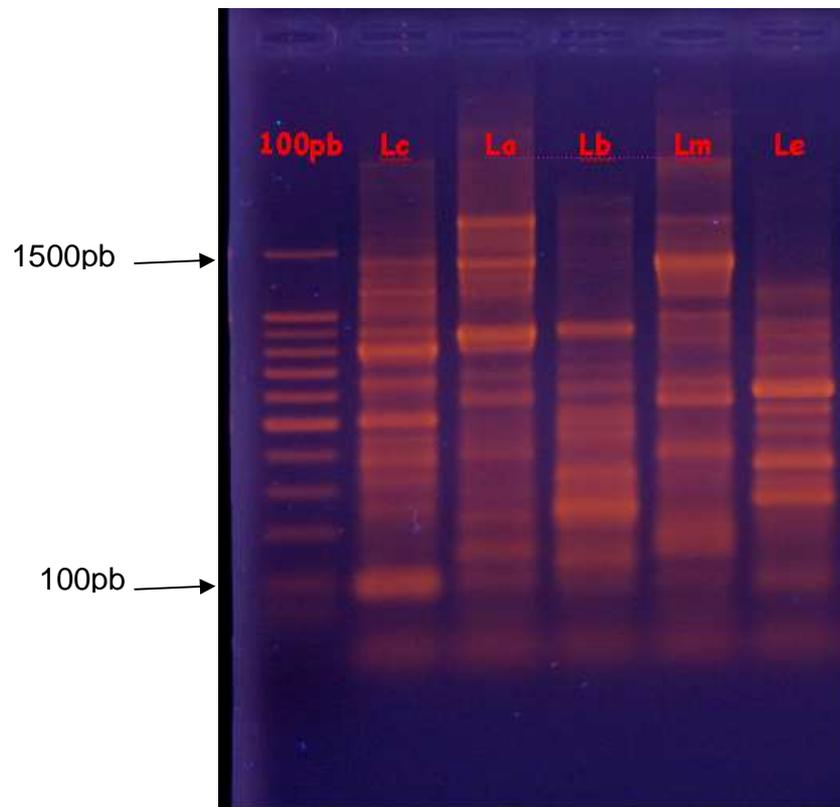


Figura 3: Reação de ERIC-PCR para amostras de referência de *Leishmania*. Lc (*L. (L.) chagasi*); La (*L.(L.) amazonensis*); Lb (*L.(V.) braziliensis*); Lm (*L. (L.) mexicana*) e Le (*L. (V.) equatorensis*).

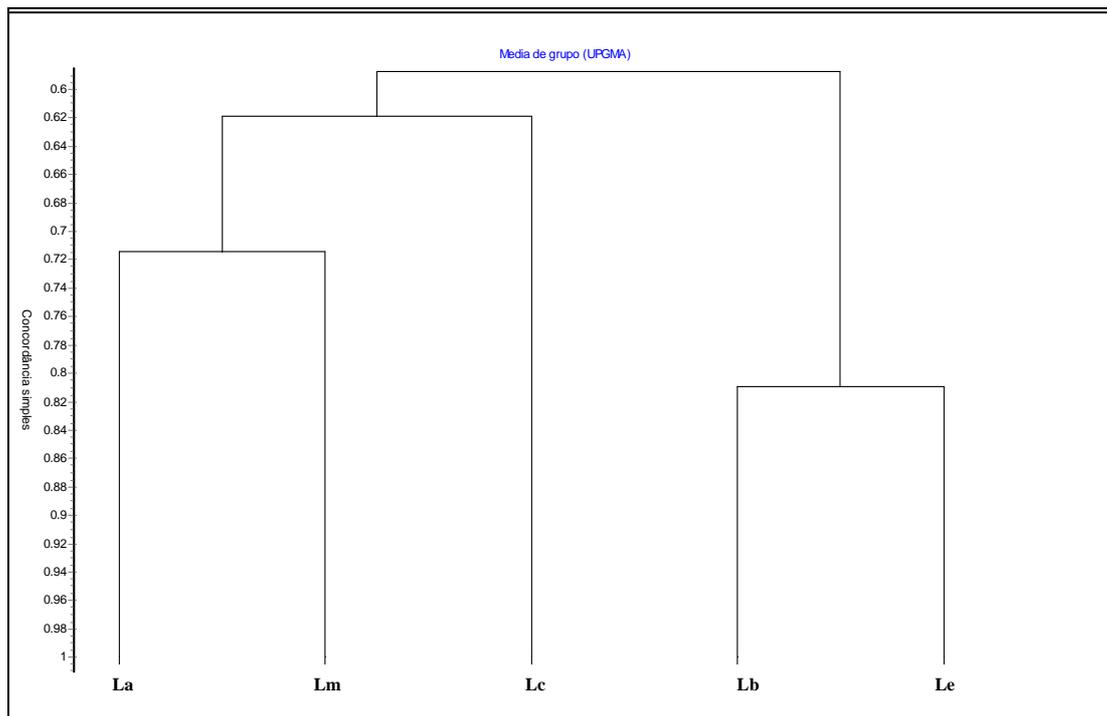


Figura 4: Dendrograma demonstrando grau de similaridade, calculado pelo índice de concordância simples, para amostras de referência de *Leishmania*, a partir da análise de dados do ERIC-PCR. La (*L.(L) amazonensis*); Lm (*L. (L)mexicana*); Lc (*L.(L)chagasi*); Lb (*L.(V) braziliensis*) e Le (*L. (V) equatorensis*). Correlação cofenética = 0,93.

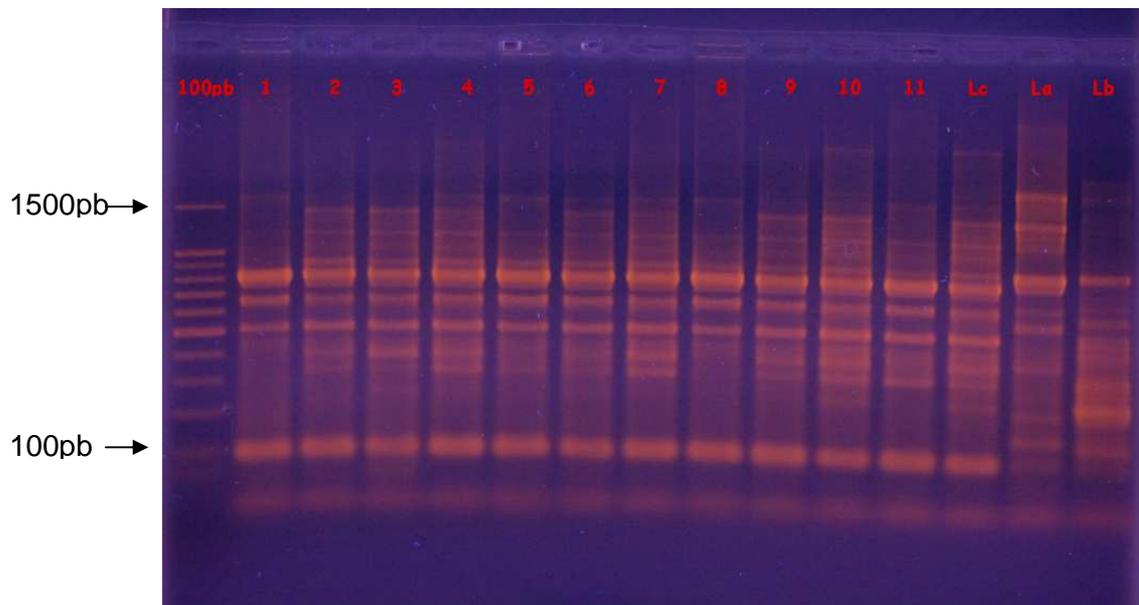


Figura 5: Reação de ERIC-PCR para amostras de *Leishmania* isoladas de 11 portadores de leishmaniose visceral, no Estado de Mato Grosso do Sul em comparação com amostras de referência. Lc (*L. (L.) chagasi*); La (*L.(L.) amazonensis*) e Lb (*L.(V.) braziliensis*).

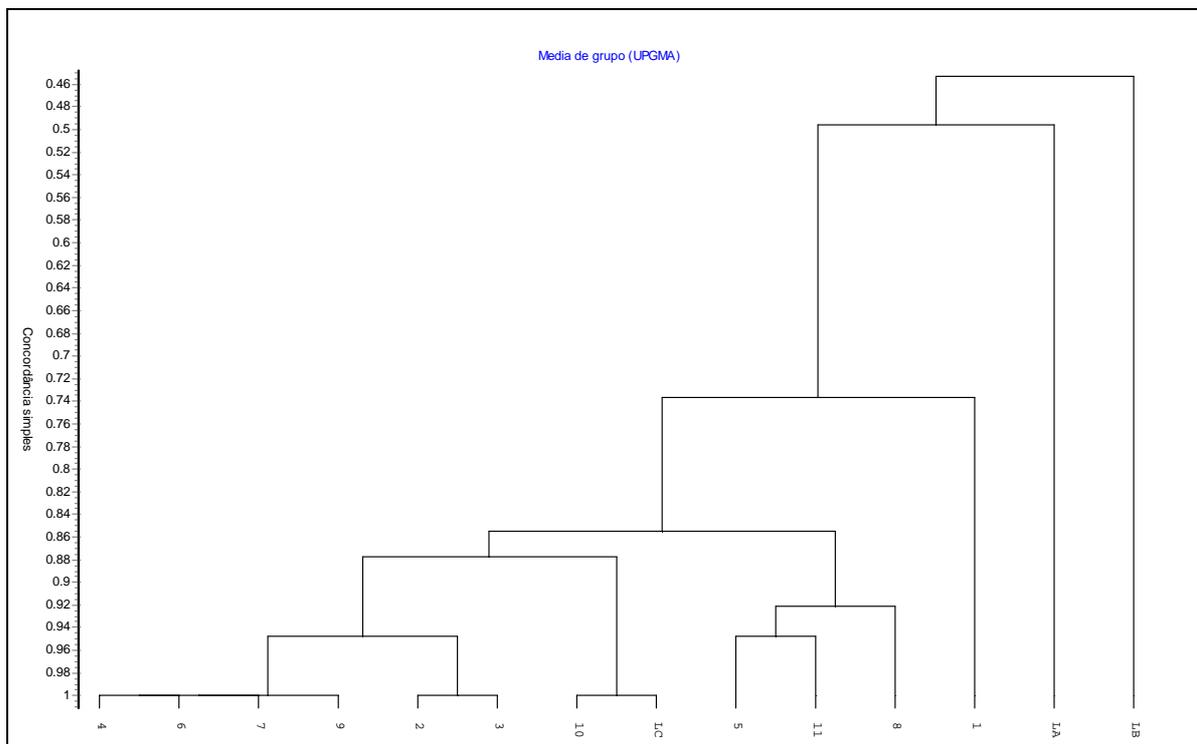


Figura 6: Dendrograma demonstrando grau de similaridade, calculado pelo índice de concordância simples, a partir da análise de dados do ERIC-PCR, para 11 amostras de *Leishmania* isoladas de portadores de leishmaniose visceral, no Estado de Mato Grosso do Sul em comparação com amostras de referência. Lc (*L. (L.) chagasi*); La (*L.(L.) amazonensis*) e Lb (*L.(V.) braziliensis*). Correlação cofenética = 0,96.

## 6 DISCUSSÃO

O gênero *Leishmania* é considerado como sendo o que apresenta o maior número de espécies, entre os protozoários que afetam humanos (REITHINGER e DUJARDIN, 2007). A possibilidade de identificação dessa variedade de espécies torna-se impossível se considerarmos os métodos tradicionais de avaliação morfológica. Esta característica, associada a outros fatores, possivelmente implicaria em uma pressão de seleção sobre o parasito resultando em variabilidade genética entre as espécies ou em uma mesma espécie (BAÑULS et al., 2002, BAÑULS et al., 2007)

O modo de reprodução do parasito, mesmo não tendo sido claramente elucidado, dá indícios de ser predominantemente assexuado. Esta forma de reprodução deveria limitar a variabilidade genética em *Leishmania*, pois, em teoria, um clone deve ser uma cópia da célula original. No entanto, há algum tempo, estudos têm apontado para a existência dessa diversidade no gênero *Leishmania* (THOMAZ-SOCCOL et al., 1993; CUPOLILLO et al., 1994; GRIMALDI e MCMAHON-PRATT, 1996, DUJARDIN et al., 2002) sendo então possível imaginar que o fenômeno das mutações é responsável pela diversidade genética presente nestes parasitos (LAINSON e SHAW, 1987; CIBULSKIS, 1988; VICTOIR e DUJARDIN, 2002).

Considerando que mais de um processo de mutação deve estar envolvido na variabilidade de isolados de *Leishmania*, pode-se afirmar que identificar estas mutações deve ser difícil a depender do tipo de teste executado (CHICHARRO et al., 2002; BARKER, 2002). Como exemplo pode-se citar a análise de isoenzimas. Este método é considerado um padrão de referência na caracterização de amostras de *Leishmania*. No entanto, pelo fato de detectar enzimas que possuem diferentes cargas e não as diferenças alélicas, há a possibilidade de que alguns genótipos possam ser considerados idênticos quando na verdade não o são (CIBULSKIS, 1988).

Em relação ao estudo de amostras de *Leishmania* diversos trabalhos e

técnicas buscam não só executar diagnóstico mais seguro, identificando espécies, como também verificando a variabilidade existente entre as amostras (FALQUETO et al., 1998; CUERVO et al., 2004; LIMA JÚNIOR et al., 2009)

A PCR utilizando *primers* para elementos intergênicos repetitivos de enterobactérias é uma técnica com grande potencial de uso no estudo de diversos tipos de organismos, sejam procariotos ou eucariotos complexos.

Sua aplicação envolvendo um único passo de PCR, a não necessidade de uso de sistema de restrição e o fato de detectar sequências conservadas distribuídas no genoma de muitas espécies (VERSALOVIC et al., 1991) torna o método viável e eficiente em estudos taxonômicos, epidemiológicos e na caracterização de estruturas de populações e diferenciação entre amostras de um determinado gênero ou espécie (RODRIGUEZ-BARRADAS et al., 1995; JERSEK et al., 1999; FERREIRA et al., 2001; OSÓRIO, 2002; GODOY et al., 2004; ZULKIFLI et al. 2009).

No presente estudo, a amplificação do genoma das amostras de referência de *Leishmania* com esta técnica, possibilitou, pela primeira vez, sua aplicação para este gênero.

O agrupamento distinto das amostras de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* foi um fato relevante, especialmente ao se considerar que em muitas regiões, como no Mato Grosso do Sul, há a concomitância dessas duas espécies. Novos estudos com a técnica de ERIC-PCR são necessários para validação do método no diagnóstico da LT. Os dados aqui apresentados indicam que a técnica potencialmente é capaz de diferenciar as espécies causadoras de LT no Estado do MS, assim como os possíveis casos de LV causados por *L. amazonensis*.

O agrupamento da amostra de referência de *L. chagasi* em relação a *L. amazonensis* e *L. braziliensis* ocorreu com grau de similaridade menor que 50%. Este índice indica uma confiabilidade muito grande no poder discriminatório dessas espécies, porém ainda considerando que pertencem ao mesmo gênero. A ERIC-PCR seria, portanto, muito útil na discriminação entre elas, proporcionando maior atenção aos pacientes e a possibilidade de rastreamento epidemiológico.

Muitas vezes a identificação de espécies de *Leishmania* é realizada com

precisão quando há associação das técnicas de PCR e RFLP (CHICHARRO et al., 2002; FLOETER-WINTER, 2010). Isso demanda maior tempo e gasto de material para alcançar o referido objetivo.

Vários trabalhos têm comprovado que a técnica de ERIC-PCR pode não só identificar espécies como também caracterizar e agrupar cepas dentro de uma mesma espécie (JUDD et al., 1993; RODRIGUEZ-BARRADAS et al., 1995; JERSEK et al., 1996; FERREIRA et al., 2001)

No dendrograma gerado (Figura 6) é possível verificar que as amostras clínicas agruparam-se com alto grau de similaridade à cepa de referência de *L. chagasi*.

Mesmo considerando que a amostra de número 1 teve menor valor de aproximação (73%) pode-se considerar o alto poder discriminatório da técnica. Esta variação com a amostra 1 poderia ser possivelmente atribuída a localização geográfica diferenciada da respectiva amostra, pois as amostras de 2 a 11 foram isoladas em indivíduos portadores de LV na capital, Campo Grande, enquanto a amostra 1 foi obtida de paciente proveniente do interior do Estado. Seria indicada maior investigação empregando amostras de *L. chagasi* provenientes de outras regiões do Estado de MS, e de outros estados do Brasil, com o propósito de confirmar se esta técnica é capaz de detectar variações, em isolados geográficos distintos. Sugerimos também que estudos futuros possam usar a ERIC-PCR na avaliação de amostras de *L. chagasi* isoladas em pacientes de diferentes faixas etárias, especialmente comparações entre a população adulta e infantil, bem como em amostras isoladas de cães e outros reservatórios.

Este dado não compromete a eficácia da técnica, neste estudo, uma vez que a amostra 1 não foi agrupada junto a outras espécies, permanecendo no agrupamento relacionado a *L. chagasi* e também por esta amostra apresentar bandas que foram consideradas específicas para a espécie de referência. Pelo desempenho da técnica frente às amostras de referência e pelos estudos prévios com outros organismos, é provável que este fato apenas reforçe a sensibilidade e o poder discriminatório da ERIC-PCR.

Esta sensibilidade pode também ser verificada quando constatamos que

uma única banda foi relevante para agrupar de forma diferenciada as amostras 2 e 3 das amostras 4, 6, 7 e 9. Isso nos leva a pensar no potencial de estudos futuros com esta técnica envolvendo pacientes com distintos perfis clínicos, idade, estado imunitário e outras variantes.

O zimodema de *Leishmania infantum*, denominado MON-1, é alvo de investigação devido a grande variedade de apresentações clínicas relacionadas com a infecção. Estudo realizado com isolados de *Leishmania (Leishmania) infantum* zimodema MON-1, provenientes da Europa, revelou que estes isolados ao serem avaliados pela técnica de RAPD foram agrupados em dez diferentes genótipos muito heterogêneos. Os autores afirmam que para uma correta classificação filogenética do gênero *Leishmania*, é necessário que se use diferentes marcadores moleculares (HIDE et al., 2001). Esta informação reforça que uma nova técnica pode ser de grande valor na definição das populações de *Leishmania*.

Outra vantagem da ERIC-PCR para estudos de agrupamentos está relacionada com sua reprodutibilidade. Em estudo com amostras de *Salmonella Typhi* esta técnica foi superior ao RAPD, com índice discriminatório (ID) de 0,9821 e reprodutibilidade de 100%, enquanto o RAPD obteve ID satisfatório (0,8978) porém apresentou apenas 40% de reprodutibilidade (NATH et al., 2010). Este relato está de acordo com o que percebemos ao executar a ERIC-PCR em amostras de *Leishmania chagasi* ao considerarmos que foi capaz de discriminar todas as amostras testadas.

A técnica mais utilizada para classificação do gênero *Leishmania*, baseia-se no padrão gerado pela análise de isoenzimas (CUPOLILLO et al., 1994). A sensibilidade dessa técnica é relevante para sua aplicação em estudos epidemiológicos. No entanto, verifica-se que a operacionalidade do método pode torná-lo inviável quando aplicado a necessidade de diagnóstico de rotina, especialmente considerando as particularidades dos diversos laboratórios no Brasil.

Dessa forma, consideramos que a técnica de ERIC-PCR proporciona resultados confiáveis, boa sensibilidade e especificidade, facilidade de obtenção

do resultado, o que justificaria seu uso em diversas situações referentes ao conhecimento da epidemiologia dessas enfermidades, diagnóstico laboratorial, diferenciação de espécies causadoras de leishmaniose tegumentar, avaliação de pacientes provenientes de áreas nas quais há ocorrência concomitante de mais de uma espécie de *Leishmania* e a possibilidade de se estabelecer parâmetros de controle da doença.

Outros estudos com esta técnica, aplicados a amostras de *Leishmania* são importantes para determinar sua capacidade de diferenciar espécies, não avaliadas neste trabalho, bem como no estabelecimento de um perfil genético da *Leishmania chagasi* no Mato Grosso do Sul. Importante também será a associação dessa técnica com a tecnologia de sondas de DNA, permitindo estudos mais consistentes sobre o genoma e a diversidade desses parasitos.

Revelar estas características genéticas pode auxiliar o entendimento da dinâmica epidemiológica da doença e futuramente ser possível estabelecer parâmetros clínicos associados com determinada cepa, elucidar os mecanismos de interação do parasito com o sistema imune dos hospedeiros, auxiliar no controle de vetores e reservatórios, fundamentar a abordagem terapêutica da enfermidade e contribuir para a classificação taxonômica do gênero *Leishmania*.

## 7 CONCLUSÕES

- a) Os dados obtidos neste estudo revelam a primeira descrição do uso da técnica de ERIC-PCR na caracterização de amostras de *Leishmania* spp.
- b) Pelo sucesso obtido na amplificação foi possível constatar a presença de sequências repetitivas intergênicas (ERIC) em amostras de *Leishmania chagasi*. Este fato indica que a técnica pode ser usada para identificação de isolados de *Leishmania*.
- c) A técnica foi eficaz em demonstrar a variabilidade genética entre isolados de *L. chagasi*, provenientes do Mato Grosso do Sul.
- d) As amostras clínicas testadas apresentaram diversidade genética entre elas e em relação à amostra de referência de *L. chagasi*.
- e) Estas constatações permitem prever o emprego da técnica em estudos mais amplos, com amostras de diferentes origens, incluindo possíveis reservatórios, e a possibilidade de uso como método auxiliar ao diagnóstico de rotina.

## REFERÊNCIAS

Aguiar GM, Medeiros WM. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: Rangel EF, Lainson R (Org.). Flebotomíneos no Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003, 368p.

Alfenas, AC. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins – fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, 1998. 574 p.

Aljeboori TI, Evans DA. *Leishmania* spp. in Iraq. Electrophoretic isoenzyme patterns. I. Visceral leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1980a, 74(2):169-177.

Aljeboori TI, Evans DA. *Leishmania* spp. in Iraq. Electrophoretic isoenzyme patterns. II. Visceral leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1980b, 74(2):178-184.

Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clinics in Dermatology. 1996, 14:523-532.

Ashford, RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. International Journal for Parasitology. 2000, 30:1269-1281.

Assis TSM, Braga ASC, Pedras MJ, Barral AMP, Siqueira IC, Costa CHN. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2008, 17(2):107-116.

Awasthi A, Kumar R, Saha MB. Immune response to *Leishmania* infection. *The Indian Journal of Medical Research*. 2004, 19:238-258.

Bañuls AL, Hide M, Tibayrenc, M. Evolutionary genetics and molecular diagnosis of *Leishmania* species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002, 96(1): 9-13.

Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances Parasitology*. 2007, 64:1–109.

Barker GC. Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002, 96(1): 21-24.

Beckman JS, Weber JL. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*. 1992,12:627–631.

Bergmann F, Hattermer HH. Isozymes in forest genetics research. In: Mandal AK, Gibson GL. (Ed.). *Forest Genetics and Tree Breeding*. New Dehli: CBS Publishers e Distributors, p. 227-238, 1998.

Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical Infectious Diseases*. 1997, 24:684-703.

Beverley SM, Ismach RB, McMahon Pratt D. Evolution of the genus *Leishmania* as revealed by comparisons of nuclear DNA restriction fragment patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987, 84:484-488.

Botelho ACA, Natal D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2009, 42(5):503-508.

Brasil. MS - Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2003,120p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. 180 p.

Brito ME, Andrade MS, Mendonça MG, Silva CJ, Almeida EL, Lima BS et al. Species diversity of *Leishmania* (Viannia) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Tropical Medicine and International Health*. 2009, 14(10):1278-86.

Chance ML. The identification of *Leishmania*. In: Problems in identification of parasites and their vectors. Oxford: Blackwell Scientifics Publications; 1979. p.31-35.

Chicharro C, Morales MA, Serra T, Ares M, Salas A, Alvar J. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002, 96 (1): 93-99.

Cibulskis RE. Origins and organization of genetic diversity in natural populations of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*. 1988, 96:303-322.

Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Morales A, De-Carrasquilla CF, Young DG et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1989,40:480-486.

Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *The Indian Journal of Medical Research*. 2006, 123:357-388.

Cuervo P, Cupolillo E, Nehme N, Hernandez V, Saravia N, Fernandes O. *Leishmania* (Viannia): genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. *Experimental Parasitology*. 2004, 108: 59–66.

Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994, 50:296-311.

Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1998;93(5):663-8.

Dedet JP. *Leishmania* et leishmanioses du continent américain. *Annals Institute Pasteur*. 1993, 4:3-25.

Desjeux, P. Leishmaniasis: current situations and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2004, 27:305-318.

Dorval MEMC. Estudos epidemiológicos em área de leishmaniose tegumentar no município de Bela Vista, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. [Tese]. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: UFMS, Campo Grande; 2006.

Dujardin JC, Victoir K, De Doncker S, Guerbouj S, Arévalo J, Le Ray D. Molecular epidemiology and diagnosis of *Leishmania*: what have we learnt from genome structure, dynamics and function? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002, 96(1): 81-86.

Dujardin JC. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends in Parasitology*. 2006, 22(3):4-6.

Falqueto A, Cupolillo E, Machado GM, Carvalho-Paes LE, Grimaldi Jr G. A New Enzymatic Variant of *Leishmania (Leishmania) forattinii* Isolated from *Proechimys iheringi* (Rodentia, Echimyidae) in Espírito Santo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1998, 93 (6): 795-798.

Fernandes O, Murthy V, Kurath U, Degraeve W, Campbell D. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1994, 66:261-271.

Ferreira AMT, Suzart S, Vidotto O, Knowles DP, Vidotto MC. Use of repetitive DNA elements to detect genetic relationships among *Anaplasma marginale* isolates. *FEMS Microbiology Letters*. 2001, 197:139-143.

Ferreira ME, Grattapaglia D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa Cenargen, 2 ed, Brasília, DF, 1996. 220p.

Floeter-Winter LM. Descrição e utilização de alvos moleculares para identificação de *Leishmania* por PCR. *Boletim Epidemiológico Paulista*. 2010, 7(73).

Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gárate T, Canavate C. Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2010, 28(5):284–293.

Fraga J, Montalvo AM, Doncker S, Dujardin JC, Auwera GV. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*. 2010, 10:238–245.

Gadisa E , Genetu A, Kuru T, Jirata D, Dagne K, AseVa A et al. *Leishmania* (Kinetoplastida): Species typing with isoenzyme and PCR–RFLP from cutaneous leishmaniasis patients in Ethiopia. *Experimental Parasitology*. 2007, 115:339–343.

Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson R (org.) *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 2003. p. 23-51.

Gama M. Perfil clínico e laboratorial da forma oligossintomática da leishmaniose visceral americana. [Tese]. Departamento de Patologia: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2001.

Garcia FCB, Santos SSR, Chociay MF, Medeiros ACR, Roselino AMF. Métodos subsidiários para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA): comparação dos resultados do seqüenciamento de DNA e da PCR-RFLP para determinação da espécie de *Leishmania* em amostras cutâneo-mucosas. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. 2005, 80(3).

Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GAJ, Acosta N, Arias ARD, Miles MA Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*. 2003, 421:936-939.

Genaro O. Leishmaniose Visceral Americana. In: Rey, L. *Parasitologia Humana*. 10 ed. São Paulo: Atheneu; 2003. p 56-72.

Godoy P, Cano J, Gene J, Guarro J, Hofling-Lima AL, Colombo AL. Genotyping of 44 Isolates of *Fusarium solani*, the Main Agent of Fungal Keratitis in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, 42(10): 4494–4497.

Gomes RF, Macedo AM, Pena DJ, Melo MN. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Experimental Parasitology*. 1995, 80:681-687.

Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Reviews. Anti Infect. Therapy*. 2010, 8(4): 419-433.

Goto H, Prianti MG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. 2009, 51(5):241-246.

Grimaldi Jr G, McMahon-Pratt D. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1996, 91:37-42.

Grimaldi Jr G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1989, 41:687-727.

Grimaldi Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clinical Microbiology Reviews. 1993, 6(3):230-250.

Grimaldi Jr G. ; Momen H, Soares MJ, Moriearty PL. Enzyme variation and difference in infectivity within a single strain of *Leishmania mexicana mexicana*. International Journal for Parasitology. 1982, 12:185-189.

Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson ADM. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment, and a proposed research and development agenda. The Lancet. 2002, 360:93-101.

Guevara P, Alonso G, da Silveira JF, de Mello M, Scorza JV, Anez N, Ramirez JL. Identification of new world *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. Molecular Biochemical Parasitology. 1992, 56:15-26.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. The Lancet. 1999, 354:1191-1199.

Hide M, Bañuls AL, TIBAYRENC M. Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology*. 2001, 123: 425-432.

Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*. 1991, 5:825-834.

Ikuta YM, Ishikawa EAY. Avaliação isoenzimática e molecular de cepas de *Leishmania (Viannia) lainsoni*. *Revista Paraense de Medicina*. 2003,17(3):6-10.

Jersek B, Gilot P, Gubina M, Klun N, Mehle J, Tcherneva E et al. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. *Clinical Microbiology*. 1996,37(1):103-9.

Judd AK, Schneider M, Sadowsky MJ, Bruijn FJ. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. *Applied and environmental microbiology*. 1993, 59(6):1702–1708.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*. 1990, 4:1-24.

Kreutzer RD, Souraty N, Semko ME. Biochemical identities and differences among *Leishmania* species and subspecies. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1987, 36:22-32.

Lainson R, Rangel EF. Ecologia das Leishmanioses: *Lutzomyia longipalpis* e a Eco-epidemiologia da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) no Brasil. In: Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. FIOCRUZ: Rio de Janeiro, 311-336, 2003.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W, Killick-Kendrick R. The leishmaniasis in biology and epidemiology. Academic Press: London, 1-120, 1987.

Lainson, R. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W.; Killick-Kendrick, R. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press, 1987, cap. 1, p. 1-121.

Levine ND. Tratado de Parasitologia Veterinária. Espanha: Acribia, 1983. 273p.

Lima Junior MSC, Andreotti R, Dorval MEMC, Oshiro ET, Oliveira AG, Matos MFC. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2009, 42(3): 1-6.

Lima VMF, Gonçalves ME, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Feitosa MM. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. 2003, 36(4):485-89.

Liu PY, Lau YJ, Hu BS, Shyr JM, Shi ZY, Tsai WS et al. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995a, 33(7):1779–1783.

Liu PY, Shi ZY, Lau YJ, Hu BS, Shyr JM, Tsai WS et al.. Comparison of different PCR approaches for characterization of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995b, 33(12):3304-3307.

Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, Bruijn FJ. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and environmental microbiology*. 1994. 60:2286–2295.

Luz ZMP, Silva AR, Silva FO, Caligiorne RB, Oliveira E, Rabello A. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009, 104(1): 62-66.

Macedo AM, Melo MN, Gomes RF, Pena SDJ. DNA fingerprints: a tool for identification and determination of the relationship between species and strains of *Leishmania*. *Molecular Biochemical of Parasitology*. 1992, 53: 63-70.

Madruga CR, Leal CRB, Ferreira AMT, Araújo FR, Bonato ALV, Kessler RH et al. Genetic and antigenic analysis of *Babesia bigemina* isolates from five geographical regions of Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2002, 22(4):153-160.

Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. Identification and Differentiation of *Leishmania* Species in Clinical Samples by PCR Amplification of the Miniexon Sequence and Subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003, 41(7):3147-3153.

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

Marzochi MCA, Marzochi KBF, Schubach AO. Leishmaniose Visceral Americana (Calazar Americano ou Neotropical). In: *Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais*. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2001. p 65-80.

McMahon-Pratt D, Bennet E, David JR. Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of *Leishmania braziliensis*. *Journal of Immunology*. 1982, 129:926-929.

Medeiros ACR. Análise filogenética das espécies de *Leishmania* implicadas na Leishmaniose Tegumentar Americana em pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São

Paulo. [Tese]. Faculdade de Medicina. Ribeirão Preto:Universidade de São Paulo; 2002.

Mendoza-Leon A, Havercroft JC, Barker DC. The RFLP analysis of the Beta-tubulin gene region in New World *Leishmania*. *Parasitology*. 1995, 111:1-9.

Moreno EC, Gonçalves AV, Chaves AV, Melo MN, Lambertucci JR, Andrade ASR et al. Inaccuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Soluble and Recombinant Antigens to Detect Asymptomatic Infection by *Leishmania infantum*. *Plos Neglected Tropical Disease*. 2009, 3(10): e536.

Moss DW. Isoenzymes. London e New York: Chapman & Hall, 1982. 200 p.

Motazedian H, Noyes H, Maingon R. *Leishmania* and *Sauroleishmania*: The Use of Random Amplified Polymorphic DNA for the Identification of Parasites from Vertebrates and Invertebrates. *Experimental Parasitology*. 1996, 83:150–154.

Murphy RW, Sites JWJr, Buth DG, Haufler CH. Proteins I: Isozyme eletrophoresis. In: Molecular systematics. Hillis DM, Moritz C (Eds) Sinauer Associates, Sunderland MA, pp 44-126,1990.

Nath G, Maurya P, Gulati AK. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of Salmonella Typhi strains isolated over a period of two decades. *Infectious, Genetics and Evolution*. 2010, 10(4):530-6.

Noyes HA. Implications of a neotropical origin of the genus *Leishmania*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1998, 93:657-661.

Oliveira CI, Báfica A, Oliveira F, Favali CBF, Correa T, Freitas LAR, et al. Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis. Clinical Infections Diseases. 2003, 37:149-53.

Osório ALAR. Polimorfismo genético de *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* no Pantanal brasileiro e caracterizações antigênica e ultraestrutural de suas frações subcelulares. [Tese]. Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária. Campo Grande:UFMS/FIOCRUZ; 2002.

Pereira, EFA. Variabilidade genética e diagnóstico molecular da *Leishmania* spp., pelas técnicas de RAPD e PCR, no Estado do Paraná e importados. [Dissertação] Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.

Pirmez C, Valéria ST, Manoel PON, Da-Cruz AM, Costa SCG, Marcos C, Win D, Fernandes O. Use of PCR in diagnosis of human American Tegumentary Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Clinical Microbiology. 1999, 37(6): 1819-1823.

Pogue GP, Koul S, Lee NS et al. Identification of intra and interspecific *Leishmania* genetic polymorphisms by arbitrary primed polymerase chain reactions and use of

polymorphic DNA to identify differentially regulated genes. *Parasitology Research*. 1995, 81:282-290.

Pratlong F, Dereure J, Ravel C, Lami P, Balard Y, Serres G et al. Geographical distribution and epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048 strains. *Tropical Medicine and International Health*. 2009, 4(9):1071-85.

Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009, 104(7): 937-954.

Ravel C, Cortes S, Pratlong F, Morio F, Dedet JP, Campino L. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *International Journal of Parasitology*. 2006, 36:1383–1388.

Reithinger R, Dujardin JC. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007, 45(1): 21–25.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2007, 7(9):581-96.

Rey L. *Parasitologia - Parasitos e Doenças Parasitárias*. 4.Ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2008, 930p.

Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perières J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de parasitologie humaine et compare*. 1990, 65: 111-25.

Rodriguez-Barradas MC, Hamill RJ, Houston ED, Georghiou PR, Clarridge JE, Regnery RL, Koehler JEJ. Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. *Clinical Microbiology*. 1995, 33(5):1089-93.

Rodríguez-González I, Marín C, Vargas F, Córdova O, Barrera M, Gutiérrez-Sánchez R. Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. *Experimental Parasitology*. 2006,112: 44–51.

Roitt IM, Brostoff J, Male DK. *Imunologia*. 6. ed. São Paulo: Manole, 2002.

Romanha, A.J. Introdução às isoenzimas e sua utilização na caracterização de leishmanias e tripanosomas. *Gráfica da Universidade Federal de Minas Gerais*, Belo Horizonte, v. 84, p. 1-33, 1982.

Romero HD, Silva LA, Silva-Vergara ML, Rodrigues V, Costa RT, Guimarães SF. Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009, 81(1): 27–33.

Rougeron V, De Meeu T, Ouraga SK, Hide M, Bañuls AL. “Everything You Always Wanted to Know about Sex (but Were Afraid to Ask)” in *Leishmania* after Two Decades of Laboratory and Field Analyses. *PLOS Pathogens*. 2010, 6(8): e1001004.

Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology*. 2001, 55:453-483.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988, 239(4839):487-491.

Schonian G, Mauricio I, Cupolillo E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends in Parasitology*. 2010, 975 (*in press*).

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE. RIO GRANDE DO SUL. Núcleo de Vigilância dos Riscos e Agravos Ambientais Biológicos. Situação da Leishmaniose Visceral no RS. Rio Grande do Sul, 2009. [atualizada em 17 de março de 2009, acesso em 05 de outubro de 2010]. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/dados/1239825393188SITUA%C7%C3O%20NO%20RS.pdf>.

SHAW, JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2006, 101(5): 577-579.

Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: Present and future trends and their implications. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1994, 89(3): 471-478.

Shaw JJ, Ishikawa EA, Lainson R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein labelled avidin. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1989, 83:783-4.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1984, 79:511.

Silva ES, Pirmez C, Gontijo CMF, Fernandes O, Brazil, RP. Visceral leishmaniasis in the crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. Veterinary Record. 2000, 147:421-422.

Silva ES, Schoone GJ, Gontijo CMF, Brazil RP, Pacheco RS, Schallig HDFH. Application of Direct Agglutination Test (DAT) and Fast Agglutination Screening Test (FAST) for sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. Kinetoplastid Biology and Disease. 2005;4:4.

Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Póvoa MM. Leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* (L.) as a reservoir of Amazonian

visceral leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1982, 76:830-832.

SINAN/DVS/SES/MS. Campo Grande: SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO MATO GROSSO DO SUL; [atualizada em 05 de agosto de 2010, acesso em 05 de setembro de 2010]. Disponível em:  
[http://www.saude.ms.gov.br/index.php?templat=vis&site=116&id\\_comp=634&id\\_reg=5264&voltar=lista&site\\_reg=116&id\\_comp\\_orig=634](http://www.saude.ms.gov.br/index.php?templat=vis&site=116&id_comp=634&id_reg=5264&voltar=lista&site_reg=116&id_comp_orig=634)

Stites DP, Parslow TG, Terr AI. Imunologia Médica. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 702p.

Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2002, 9:951-8.

Távora MPF, Pereira MAVC, Silva VL, Vita GF. Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para diagnosticar *Leishmania* sp em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical [online]. 2007, 40 (4): 482-483.

Taylor MA, Coop RL, Wall RL. Parasitologia Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 726p.

Tcherneva E, Rijpens N, Naydensky C, Herman L. Repetitive element sequence based polymerase chain reaction for typing of *Brucella* strains. *Veterinary Microbiology*. 1996, 51(1-2): 169-178.

Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratloug F, Martinidumas A, Serres E. Phylogenetic Taxonomy of New World *Leishmania*. *Annales de Parasitologie Humaine et Compare*. 1993, 68(2):104-106.

Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structure of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma*, and its medical and taxonomical consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990, 87: 2414-2418.

Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. The clonal theory of parasitic protozoa: a taxonomic proposal applicable to other clonal organisms. *Bioscience*. 1991, 41(11):767-774.

Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Sarkeski D, Ayala FJ. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity of random-primer DNA typing and multilocus isoenzyme electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993, 90:1335-1339.

Tibayrenc M. Population genetics and strain typing of micro-organisms: how to detect departures from panmixia without individualising alleles and loci. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*. 1995,318:135-139.

Tibayrenc, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *International Journal for Parasitology*. 1998, 28(1): 85-104.

Tibayrenc M, Ayala FJ. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitology* . 2002,18(9):405-410.

Urias EVR, Carvalho SFG, Oliveira CL, Carvalho MLM, Teles LF, Rodrigues MC, Maia CN. Prevalência de adultos infectados por *Leishmania chagasi* entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* [online]. 2009, 31(5): 348-354.

Vargas-Duarte JJ, López-Páez MC, Escovar-Castro JE, Fernández-Manrique J. Evaluacion por Western Blot, Inmunofluorescencia Indirecta y ELISA de Perros Infectados con *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Revista Salud Pública*. 2009,11 (4): 641-652.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl Ac Res*. 1991, 19: 6823-6831.

Victoir K, Dujardin JC. How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. *Trends in parasitology*. 2002, 18(2):81-5.

Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*. 2004, 90:31-7.

Volpini AC. PCR-RFLP mkDNA no diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania* causadoras de Leishmaniose Cutânea no Brasil. [Tese]. Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária: FIOCRUZ, Belo Horizonte; 2003.

Who. World Health Organization. Control of Leishmaniasis. Technical Report Series. 1990, 793:50-52.

Who. World Health Organization. Programmes and projects: Initiative for Vaccine Research (IVR). [acesso em 01 de setembro de 2010] Disponível em: [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/soa\\_parasitic/en/index3.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index3.html)

Yuan W, Chai TJ, Miao ZM. ERIC-PCR identification of the spread of airborne *Escherichia coli* in pig houses. *Science of the Total Environment*. 2010, 408:1446–1450.

Zulkifli Y, Alitheen NB, Son R, Raha AR, Samuel L, Yeap SK, Nishibuchi M. Random amplified polymorphic DNA-PCR and ERIC PCR analysis on *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles in Padang, Indonesia. *International Food Research Journal*. 2009, 16: 141-150.

## **ANEXOS**

## Soluções e reagentes

### 1) Meio de cultivo bifásico NNN-Schneider®

#### 1.1 Fase líquida - Schneider (pH 7,2)

Schneider's Insect Media (Sigma S9895) .....	1 frasco/L
Bicarbonato de sódio .....	0,4 g
H <sub>2</sub> O qsp .....	1000 mL
Antes do uso adicionar:	
Soro fetal bovino .....	20%
Benzilpenicilina	100 U/mL
Estreptomicina	100 µg/mL

#### 1.2 Fase sólida - NNN

Agar base para sangue (Oxoid)	40 g
H <sub>2</sub> O qsp .....	1000 mL
Sangue de carneiro desfibrinado	10%

### 2) Salina fosfatada tamponada (pH 7,2)

NaCl	8,77 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,02 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,34 g
H <sub>2</sub> O qsp .....	1000 mL

### 3) Solução de congelamento

Meio Schneider preparado no item 1.1	100 mL
Soro fetal bovino	30 mL
Glicerol	10 mL

### 4) Tampão de lavagem TE (pH 8,0)

Tris HCl (solução A)	0,2 M
EDTA (solução B)	0,1 M
2 partes solução A: 1 parte solução B	

#### 5) Tampão TBE (10x)

Tris base	0,9 M
Ácido bórico	0,9 M
EDTA	0,02 M

#### 6) Gel de agarose

Agarose (Promega V3841)	1,5 g
TBE (1x)	100 mL

#### 7) Mix para eletroforese

Go Taq Green Master Mix (Promega M712B)	12,5 µL
Primer 1 (ERIC1R)	1 µL
Primer 2 (ERIC 2)	1 µL
H <sub>2</sub> O	5,5 µL
DNA da amostra	5 µL

#### 8) Solução brometo de etídio

Solução estoque	10mg/mL em H <sub>2</sub> O
Solução de trabalho	1 mg/mL em H <sub>2</sub> O