



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
Escola de Farmácia
Laboratório de Imunopatologia



Enara Karine Bráz de Souza

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA POR
L. INFANTUM: uma revisão atual da literatura**

Ouro Preto

2019

Enara Karine Braz de Souza

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA POR
L. INFANTUM: uma revisão atual da literatura**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola de Farmácia da Universidade Federal de
Ouro Preto, como requisito parcial para obtenção do
grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt
Co-orientadora: Ms. Lívia Mendes Carvalho

Área de Concentração: Biologia Molecular.

Ouro Preto

2019

S729d Souza, Enara Karine Braz .
Diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral Humana por *L. infantum*
[manuscrito]: uma revisão atual da literatura / Enara Karine Braz Souza. -
2019.

31f.: il.: color; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de
Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Leishmaniose visceral. 2. Leishmania. 3. Leishmania infantum. 4.
Diagnóstico molecular. I. Roatt, Bruno Mendes. II. Universidade Federal de
Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.993.161

Catálogo: ficha.sisbin@ufop.edu.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

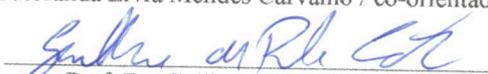
Escola de Farmácia

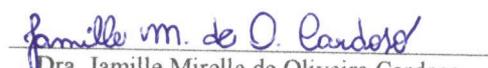


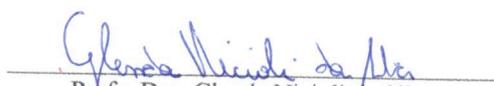
ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 460ª MONOGRAFIA DO CURSO DE FARMÁCIA DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Aos 12 dias do mês de julho de dois mil e dezenove, sexta-feira, realizou-se, a partir das 15 horas, no auditório da Escola de Farmácia, no Campus Morro do Cruzeiro, a sessão de defesa de monografia do candidato ao grau de Farmacêutico Generalista, **Enara Karine Brás de Souza**, matrícula **12.2.2195**, intitulada **“Diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral Humana por *L. infantum*: uma revisão atual da literatura”**. A Banca Examinadora foi constituída pela Dra. Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso (UFOP), pelo Prof. Dr. Guilherme de Paula Costa (UFOP), pela co-orientadora doutoranda Livia Mendes Carvalho (UFOP) e pelo orientador Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt (UFOP). De acordo com o regulamento do Curso, o orientador, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra ao candidato, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa do candidato. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do candidato e do público, tendo deliberado pela sua Aprovação, com a NOTA 9,5. Comunicou-se ao candidato que essa nota somente será liberada para a PROGRAD, após a entrega do exemplar definitivo de acordo com as normas estabelecidas pelo Sistema de Bibliotecas e Informação (Sisbin), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com as devidas correções sugeridas pela banca e com o aval escrito do orientador. Nada mais havendo para constar, a presente ata foi lavrada e após a leitura pública seguirá assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela Presidente do Colegiado. Ouro Preto, 12 de julho de 2019.


Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt / orientador


Doutoranda Livia Mendes Carvalho / co-orientadora


Prof. Dr. Guilherme de Paula Costa


Dra. Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso


Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva
Presidente do Colegiado de Farmácia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre estar me dando forças para não desistir, apesar dos obstáculos no caminho. Por estar comigo em toda a caminhada.

Agradeço aos meus pais, José Geraldo e Maria Aparecida, por acreditarem em mim. Mesmo com todas as dificuldades que encontramos pelo caminho, conseguimos alcançar a vitória. Devo todo meu agradecimento a eles.

Aos meus irmãos Erica e Victor, pela companhia. Aos meus sobrinhos Gabriel e Ana Julia pelas risadas em momentos que mesmo não demonstrando eram de muita luta e cansaço.

Ao meu namorado, Anderson, pelo apoio, paciência e carinho durante todo esse tempo.

Ao meu orientador, Bruno Roatt, por todo acolhimento e confiança e pelo privilégio de tê-lo como orientador.

A minha co-orientadora, Lívia Mendes, por prontamente me ajudar demonstrando sempre simpatia e apoio na elaboração deste trabalho.

Aos meus amigos, Daíse, Mikaely e Paulo pelas pessoas admiráveis que são, por todo conhecimento e momentos incríveis compartilhados, pelo privilégio de tê-los sempre por perto e me suportarem com todas minhas chatices.

À Universidade Federal de Ouro Preto e à Escola de Farmácia, professores e funcionários pela oportunidade do curso da graduação e pela boa convivência. Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e aceitação do convite.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

RESUMO

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. A leishmaniose visceral (LV) é considerada a forma clínica mais grave dentre as leishmanioses e é classificada como um grande problema de saúde pública, devido a sua magnitude e elevada morbidade e letalidade. Atualmente, o diagnóstico da LV é realizado pela associação de aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, entretanto ainda não existe um método que seja totalmente eficaz. Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico sensíveis e específicos torna-se necessário. Neste contexto, a biologia molecular vem propiciando a elaboração de técnicas com alta sensibilidade e especificidade o que a torna uma importante e valiosa metodologia. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo uma revisão da literatura atual constituída de estudos que abordam o uso de técnicas moleculares como forma de detecção da LV humana (LVH) causada por *Leishmania infantum*. Para cumprir com esse objetivo, foram realizadas buscas em bases de dados científicos como Scielo e PubMed para a seleção de artigos publicados entre os anos 2008 e 2018, redigidos em inglês ou português, cujos focos fossem a LVH Americana. Neste trabalho foram descritas as distintas análises que podem ser utilizadas para o diagnóstico da LVH, abrangendo exames diretos, sorologia, detecção de antígenos e exames de biologia molecular e seus avanços. A partir desta revisão, observa-se que as técnicas PCR e suas derivações têm se mostrado promissoras uma vez que se apresentam mais sensíveis e específicas quando comparadas aos métodos convencionais. Além disso, a técnica de qPCR oferece vantagens em relação à PCR convencional, incluindo processamento mais rápido, maior sensibilidade e menor risco de contaminação além de utilizar amostras menos invasivas. No entanto, esta metodologia apresenta como desvantagem, ainda, o elevado custo. Dessa maneira, o avanço biotecnológico com o desenvolvimento de metodologias moleculares mais simples, rápidas e baratas tendem a colocar, de maneira muito clara e objetiva, a PCR e suas variantes como ferramenta fundamental no diagnóstico da LVH.

Palavras-chaves: leishmaniose visceral humana, diagnóstico molecular, *Leishmania infantum*

ABSTRACT

Leishmaniasis is a complex of diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Visceral leishmaniasis (VL) is considered the most serious clinical form among leishmaniasis and is classified as a major public health problem due to its magnitude and high morbidity and lethality. Currently, the diagnosis of VL is made by the association of clinical, epidemiological and laboratory aspects, however, there is no method that is totally effective. Thus, the development of sensitive and specific diagnostic techniques becomes necessary. In this context, molecular biology has led to the development of techniques with high sensitivity and specificity, which makes it an important and valuable methodology. Therefore, this work aimed at a review of the current literature consisting of studies that address the use of molecular techniques as a way of detecting human VL (VLH) caused by *Leishmania infantum*. In order to comply with this objective, we searched scientific databases such as Scielo and PubMed for the selection of articles published between 2008 and 2018, written in English or Portuguese, with the focus on American VLH. This work describes the different analyzes that can be used to diagnose VLH, including direct examinations, serology, antigen detection and molecular biology tests and their advances. From this review, it is observed that the PCR techniques and their derivations have shown to be promising since they are more sensitive and specific when compared to the conventional methods. In addition, the qPCR technique offers advantages over conventional PCR, including faster processing, higher sensitivity and lower risk of contamination and this technique uses non-invasive samples. However, this methodology presents as a disadvantage the high cost. In this way, the biotechnological advances with the development of simple, faster and cheaper molecular methodologies tend to put, in a very clear and objective way, the PCR and its variants as a fundamental tool in the diagnosis of VLH.

Key words: human visceral leishmaniasis, molecular diagnosis, *Leishmania infantum*

ABREVIATURAS E SIGLAS

DAT	Teste de Aglutinação Direta
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ITS	Espaçador Interno Transcrito
IFI	Imunofluorescência Indireta
LAMP	Loop-mediated Isothermal Amplification
LV	Leishmaniose visceral
LVH	Leishmaniose visceral humana
LT	Leishmaniose tegumentar
MLEE	Eletroforese Enzimática <i>Multilocus</i>
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde/World Health Organization
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RT-PCR	Reverse Transcription-PolymeraseChainReaction
SCIELO	Scientific Electronic Library Online

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	3
3. OBJETIVO GERAL.....	4
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
4. METODOLOGIA.....	5
5. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
5.1 Diagnóstico da leishmaniose visceral humana.....	9
5.1.1 Diagnóstico parasitológico	9
5.1.2 Diagnóstico imunológico.....	10
5.1.3 Diagnóstico por métodos moleculares	11
6. RESULTADOS	12
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
8. REFERÊNCIAS	21

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa grave de transmissão vetorial causada por parasitos do gênero *Leishmania*. Encontra-se amplamente distribuída pelo mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Oriente Médio, África, América Central e América do Sul. Segundo a Organização Mundial da Saúde, são estimados cerca de 300.000 novos casos por ano em todo o mundo, levando ao óbito cerca de 20.000 pessoas (OMS, 2018).

No Brasil, o ciclo da transmissão é zoonótico, sendo o cão doméstico considerado o principal reservatório, e o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* o vetor de maior importância epidemiológica. Um dos principais fatores que dificulta a erradicação das leishmanioses em algumas regiões é a associação com outras doenças, como a AIDS, doença que apresenta caráter pandêmico e é considerada de alta gravidade (NUNO-MARQUES et al., 2007).

Para que haja um controle eficiente da doença evitando, assim, sua pandemização é necessário o desenvolvimento de métodos de diagnóstico sensíveis, específicos e capazes de detectar indivíduos ainda em estágios iniciais da doença. Atualmente, o diagnóstico da LV é realizado pela associação de aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Entre os métodos laboratoriais convencionais destacam-se os testes sorológicos, cultura de parasitos e visualização de parasita por microscopia, entretanto apresentam importantes limitações, como por exemplo, baixa sensibilidade e especificidade. Além disso, os métodos imunológicos são suscetíveis a reações cruzadas, o que causa considerável falha diagnóstica (GONTIJO; MELO, 2004).

Somado a isso, a aplicação de estratégias diagnósticas rápidas e confiáveis faz-se necessária, uma vez que possibilitam um controle mais eficaz da doença através de uma detecção precoce no paciente. Neste contexto, a biologia molecular vem se mostrando uma importante e valorosa metodologia, devido ao contínuo desenvolvimento de ferramentas com ensaios cada vez mais rápidos, sensíveis e específicos (CUPOLILLO, 2005).

Dentre as principais técnicas da biologia molecular utilizada no diagnóstico da LV, tem-se a reação da cadeia polimerase (PCR), a PCR-RFLP e qPCR. Elas contribuem significativamente para identificação e quantificação das espécies de *Leishmania*, no entanto nem mesmo essas técnicas têm conseguido alcançar 100% de sucesso, pois alguns desses métodos são caros ou exigem metodologia sofisticada e demorada.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão da literatura atual, compreendendo estudos publicados nos últimos 10 anos, que abordaram técnicas

moleculares como forma de diagnóstico da leishmaniose visceral humana (LVH) com foco na doença causada por *Leishmania (Leishmania) infantum*, agente etiológico da LV Americana.

2. JUSTIFICATIVA

Como discutido acima, as leishmanioses representam um grupo de doenças com distribuição mundial e um amplo espectro de manifestações clínicas, constituindo um importante problema de saúde (OMS, 2018). Dentre as leishmanioses, a leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença e leva cerca de 20 mil mortes por ano, sendo fatal em quase 100% dos casos graves não tratados (CARLI, 2011).

Existe uma grande dificuldade de diagnóstico precoce e conclusivo da LV, devido às limitações dos métodos clássicos como, por exemplo, a baixa sensibilidade e especificidade (devido a reações cruzadas com outros patógenos) e a alta invasividade (testes parasitológicos), levando a uma falta de precisão principalmente em indivíduos no início da infecção e no diagnóstico de pacientes imunossuprimidos. Com um diagnóstico conclusivo seria possível evitar resultados falsos positivos ou falsos negativos, auxiliando na implementação correta e precoce da terapêutica adequada.

Diante do exposto, os métodos moleculares têm ganhado grande destaque e aplicação no diagnóstico e prognóstico da LV por serem muitas vezes mais específicos e sensíveis em comparação aos métodos imunológicos. Desta forma, nosso trabalho buscou atualidades na literatura científica sobre os métodos moleculares para detecção da leishmaniose visceral humana causada por *Leishmania (Leishmania) infantum*, agente etiológico de LV nas Américas e principalmente no Brasil.

3. OBJETIVO GERAL

Revisar, na literatura científica dos últimos 10 anos, as principais atualidades associadas aos métodos moleculares utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral humana causada por *Leishmania (Leishmania) infantum*.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conceituar leishmaniose visceral e apresentar suas principais características;
- Apresentar os principais métodos moleculares e suas aplicações no diagnóstico e prognóstico da leishmaniose visceral humana causada por *Leishmania (Leishmania) infantum* por meio de uma revisão da literatura científica entre os anos de 2008-2018;

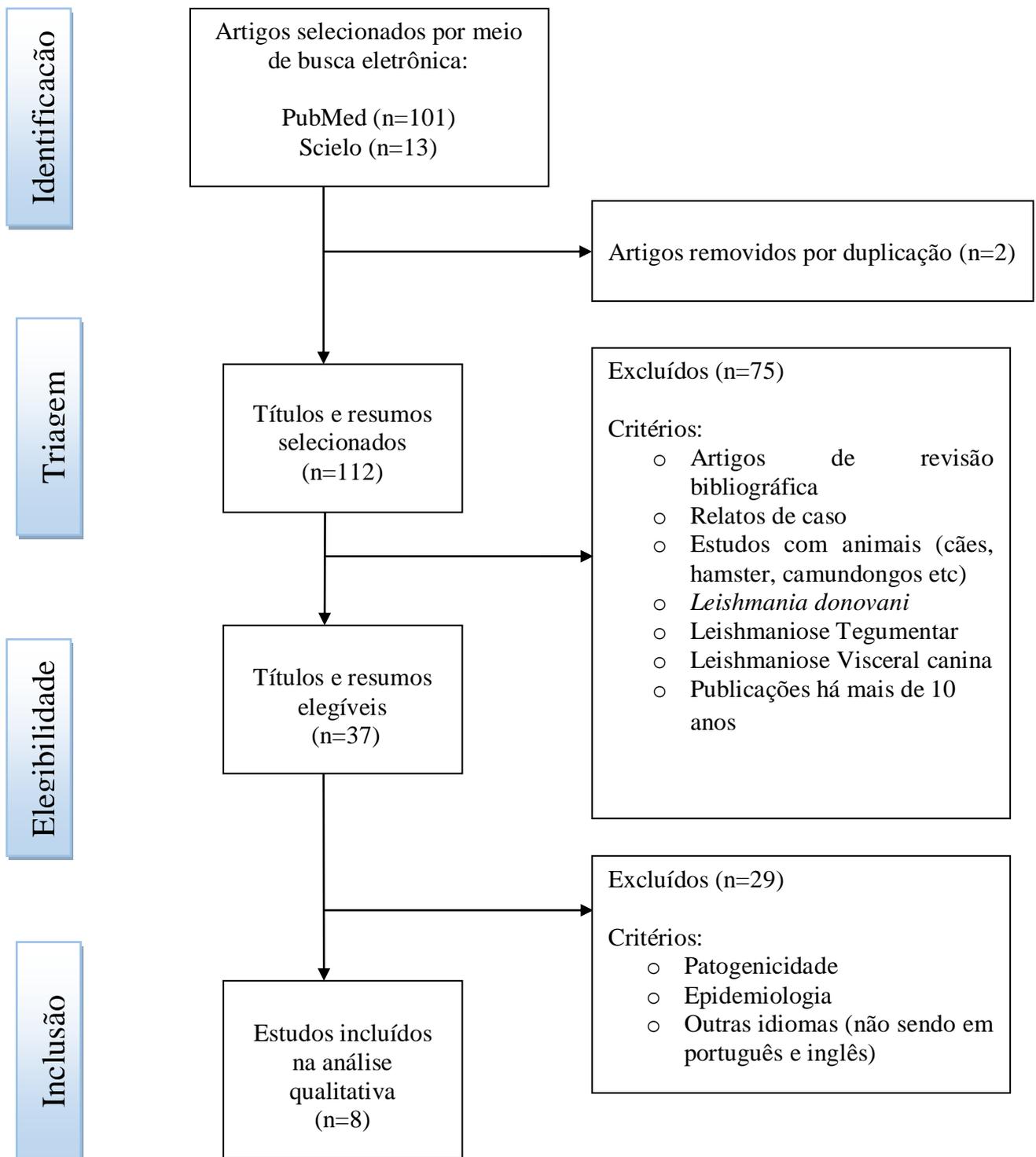
4. METODOLOGIA

Este estudo trata-se de uma revisão sistemática da literatura sobre métodos moleculares aplicados na detecção da leishmaniose visceral humana, cuja fonte de dados foram estudos primários publicados nas plataformas principais de acesso à literatura científica (SciELO e PubMed). A metodologia a seguir tem por objetivo identificar, selecionar, avaliar e sintetizar resultados de pesquisas relacionados com um problema específico que será alvo do nosso trabalho (GALVÃO; PEREIRA, 2014).

Nossa estratégia foi embasada na busca em bases de dados científicos como SciELO e PubMed bem como uma busca manual nas páginas do portal do Ministério da Saúde. Os artigos que foram selecionados ao fim da nossa busca deveriam ser redigidos em inglês ou português e a data de publicação posterior ao ano 2008 (seleção dos últimos 10 anos de produção científica na área tema). A pesquisa dos artigos nas bases SciELO foi realizada utilizando-se os descritores “leishmaniose visceral” em combinação com o descritor “diagnóstico molecular”. O operador *AND* foi utilizado entre os termos. Para a busca na base PubMed, os descritores foram utilizados em inglês, sendo eles “human visceral leishmaniasis” e “*Leishmania infantum*” em combinação com o descritor “*molecular diagnosis*”. O operador *AND* foi utilizado entre os termos. Para todas as bases de dados, os artigos selecionados para este trabalho foram publicados entre o período de Janeiro de 2008 e Janeiro de 2018. Complementando este critério, aqueles trabalhos que se enquadravam no período citado, mas que não abordavam temas relacionados ao diagnóstico da LVH foram excluídos e, portanto, não compuseram o presente trabalho. O Fluxograma 1 descreve, de forma objetiva, como os artigos científicos utilizados neste estudo foram triados e selecionados.

Nesse contexto, a partir dos resultados apresentados, após a realização das buscas dos artigos nas bases de dados foi realizada a leitura dos títulos e dos resumos dos artigos encontrados, a fim de selecionar apenas os que correspondessem aos critérios estabelecidos. Nesse momento, foram excluídos artigos de revisão e de relatos de casos, além de artigos nos quais modelos experimentais animais foram utilizados, *Leishmania donovani*, Leishmaniose Tegumentar, Leishmaniose Visceral Canina e artigos publicados há mais de dez anos. Em uma segunda etapa foi realizada a leitura do texto completo, para verificar se, de fato, abordavam o diagnóstico molecular da LVH. Nesta etapa, artigos cujos temas se relacionavam ao proposto, mas que também abordavam patogenicidade e epidemiologia e/ou não estavam escritos nos idiomas Inglês e Português foram excluídos. Todo o percurso

realizado para chegar nos artigos selecionados, bem como os critérios de inclusão e exclusão utilizados no presente trabalho estão descritos no fluxograma 1.



Fluxograma 1- Esquema para seleção dos artigos científicos utilizados neste trabalho. Bases de dados como o Scielo e o PubMed foram utilizados na busca.

5. REVISÃO DE LITERATURA

As leishmanioses são doenças parasitárias, causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Esses protozoários são parasitos intracelulares obrigatórios e se multiplicam, preferencialmente, dentro dos vacúolos de macrófagos por divisão binária simples (GONTIJO; MELO, 2004).

Consideradas um conjunto de síndromes complexas e multifacetadas, as leishmanioses apresentam diferentes formas clínicas, as quais estão relacionadas à espécie do parasito, aspectos epidemiológicos, além de fatores ligados ao indivíduo acometido (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004). Nesse contexto, dois grupos de doença são bem estabelecidos e caracterizados, sendo uma doença com apresentação cutânea chamada de Leishmaniose Tegumentar (LT) e uma doença sistêmica/visceral denominada Leishmaniose Visceral (OMS, 2018). A LV é a forma mais grave das leishmanioses sendo considerada uma doença potencialmente fatal, com distribuição mundial em 76 países, sendo endêmica em 12 países das Américas. Cerca de 90% dos casos nesta região estão concentrados no Brasil, onde se destacam as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste (OMS, 2018).

Dentre as leishmanioses, destaca-se a leishmaniose visceral (LV) considerada a forma mais grave da doença que pode ser causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, variando de acordo com a localização geográfica. A espécie *Leishmania (L.) donovani* é o agente causador da doença nas áreas do mar Mediterrâneo e da África Oriental e a espécie *Leishmania (L.) chagasi* (sin. *Leishmania (L.) infantum*) é responsável pela forma clínica da leishmaniose visceral nas Américas Central e do Sul, incluindo o Brasil (ALVAR et al., 2012). Por muito tempo, pensou-se que *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* fossem espécies diferentes, no entanto, atualmente ambas são tratadas como sinônimos, sendo a primeira nomenclatura mais utilizada (MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000).

Dada a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, a LV é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Esses fatores, somados ao uso indiscriminado de medicamentos de uso humano para o tratamento de cães além da baixa adesão ao tratamento em diversas regiões do país e do mundo, fazem com que essa doença seja um sério problema de saúde pública.

Em meados dos anos oitenta constatou-se uma transformação nos padrões epidemiológicos da LV em que a doença, antes restrita às áreas rurais do nordeste brasileiro,

avançou para outras regiões indenes alcançando a periferia de grandes centros urbanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b). Desde então, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios de todas as regiões do Brasil. A doença apresenta aspectos clínicos e epidemiológicos diversos e característicos para cada região de ocorrência, contudo as principais manifestações clínicas são febre irregular de média intensidade e longa duração, esplenomegalia e hepatomegalia além de alterações hemato-bioquímicas características (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b).

Em relação a transmissão do parasito, o inseto *Lutzomyia longipalpis* é considerado o principal vetor da *L. infantum* no Novo Mundo. Esses insetos são dípteros da família Psychodidae, subfamília Phebotominae, conhecidas, genericamente, por flebotomíneos. Apresentam-se, geralmente, de cor parda, o que explica o nome popular de “mosquito palha”. As fêmeas são responsáveis pela transmissão do parasito, devido ao fato do seu aparelho bucal ser adaptado para a realização do repasto sanguíneo. Uma higienização ambiental que impeça o desenvolvimento de formas imaturas dos flebotomíneos e reduza a atração destes para o intradomicílio é uma das formas utilizadas para combate da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b). Em relação aos reservatórios, o cão (*Canis familiaris*) é o mais importante hospedeiro vertebrado do parasito no ambiente doméstico, enquanto que as raposas (*Dusicyonvetulus e Cerdocyonthous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) contribuem para a permanência da LV no meio silvestre, sendo o último grupo um elo entre o ambiente silvestre e o domiciliar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b).

Em relação ao diagnóstico clínico, o Ministério da Saúde considera um caso suspeito de LV todo indivíduo com febre e esplenomegalia, proveniente de área com ocorrência de transmissão de LV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006a). Além disso, é suspeito todo indivíduo com febre e esplenomegalia, proveniente de área sem ocorrência de transmissão, desde que descartados os diagnósticos diferenciais mais frequentes na região (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006a). O diagnóstico clínico deve ser acompanhado pelo diagnóstico laboratorial, utilizando técnicas sorológicas como imunofluorescência indireta (IFI) ou ensaio imunoenzimático (ELISA). Entretanto, pela variabilidade nos parâmetros de sensibilidade e especificidade observada nestes testes, os testes rápidos ou testes remotos têm ganhado destaque pela facilidade de execução e o resultado rápido (até 30 minutos) com alta sensibilidade e especificidade. Além disso, técnicas parasitológicas de diagnóstico também estão disponíveis para auxiliar e confirmar ensaios sorológicos como exame direto e isolamento do parasito de aspirados em meios de cultura, os quais permitem a visualização do

parasito em microscópio óptico, além da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) que se baseia na amplificação de regiões específicas do DNA do parasito. Somado a isso, pela alta sensibilidade e especificidade dos métodos moleculares, a PCR é uma técnica bastante versátil, constituindo-se em uma nova perspectiva para o diagnóstico da LV no Brasil e no mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b).

5.1 Diagnóstico da leishmaniose visceral humana

Por ser uma doença de notificação compulsória e com características clínicas de evolução grave, o diagnóstico da LV deve ser feito de forma precisa e o mais precocemente possível (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b). Além disso, é fundamental procurar uma instituição terapêutica imediata assim que seja confirmado o diagnóstico pois, como se sabe, a LV é fatal em grande maioria dos casos sintomáticos de evolução crônica não tratados. Nesse sentido, o diagnóstico passa inicialmente com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos. Entretanto, um diagnóstico definitivo requer a demonstração do parasito através de métodos parasitológicos. O diagnóstico por parâmetros clínicos é complexo, pois a doença pode apresentar sinais e sintomas que são comuns a outras doenças presentes nas áreas onde incide a LVH, dessa forma é fundamental o diagnóstico auxiliar utilizando métodos imunológicos, parasitológicos e/ou moleculares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b). Em relação ao diagnóstico auxiliar, diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana. Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, porém, mesmo com o grande número de testes disponíveis para o diagnóstico da LV, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (GONTIJO; MELO, 2004). Dessa maneira, atualmente os métodos auxiliares para diagnóstico da leishmaniose visceral podem ser divididos em diagnóstico parasitológico, imunológico ou molecular, os quais estão descritos a seguir.

5.1.1 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico parasitológico tem por base a demonstração do parasito na amostra coletada por punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos, sendo que na LV a amostra mais utilizada é a punção aspirativa de medula óssea. O material obtido é utilizado para confecção de esfregaço ou impressão em lâminas. A especificidade deste método é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, sendo a sensibilidade mais alta alcançada quando se utiliza aspirado de baço (90-95%). Essa variação pode ser explicada pela heterogeneidade da distribuição dos parasitos em um mesmo tecido. As punções são consideradas

procedimentos invasivos e não são procedimentos adequados para estudos epidemiológicos em larga escala (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b). Para análise do material aspirado pode-se utilizar o exame direto em lâmina, após coloração por Giemsa ou Panótico Rápido para visualização de formas amastigotas do parasito, isolamento em meios de cultivo específico e/ou inoculação em animais de laboratório susceptíveis a infecção pelo parasito (ASSIS et al., 2008).

5.1.2 Diagnóstico imunológico

A LV é caracterizada por uma forte estimulação policlonal de linfócitos B, que resulta em grande produção de anticorpos e, conseqüentemente, hipergamaglobulinemia. Isso facilita o diagnóstico através de testes sorológicos/imunológicos, evitando, deste modo, os invasivos métodos parasitológicos. Diferentes técnicas sorológicas têm sido utilizadas no diagnóstico da LV, diferindo-se principalmente em sensibilidade e especificidade (GONTIJO; MELO, 2004).

Atualmente as técnicas mais utilizadas para o diagnóstico da LVH no Brasil são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), aglutinação direta (DAT) e ensaio imunoenzimático (ELISA), que utilizam antígenos brutos e apresentam sensibilidade e especificidade variáveis. Entretanto, apesar da variabilidade, devem ser a escolha imediata na suspeita clínica da doença, principalmente, pela ausência de riscos para o paciente (GONTIJO; MELO, 2004).

O método de imunofluorescência indireta utiliza como antígeno as formas promastigotas do parasito fixadas em lâmina. Apresenta uma sensibilidade alta na detecção de casos de LV. Contudo, uma das principais limitações da técnica é a ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar, prejudicando assim sua especificidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b).

O teste de ELISA é um teste mais rápido quando comparado a RIFI, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a RIFI. ELISA é o teste mais utilizado para imunodiagnóstico da LV. O método permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos. Portanto, no diagnóstico sorológico da LV é necessário considerar o diagnóstico diferencial com outras doenças (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b). Além disso, é importante salientar que para o prognóstico os testes sorológicos atuais apresentam grande limitação, pois na maioria dos casos pacientes tratados mantêm-se reativos a estas técnicas por longo período. Desta forma, muitas vezes o paciente é considerado curado clinicamente, mas ainda apresenta

parasitos viáveis que podem, a curto, médio ou longo prazo, serem causas de recidivas da doença.

5.1.3 Diagnóstico por métodos moleculares

Várias técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas para a detecção e identificação dos parasitos do gênero *Leishmania*, sem necessidade de isolamento do parasito em cultura (GONTIJO; MELO, 2004).

O diagnóstico molecular, normalmente, é realizado utilizando DNA extraído do material coletado do paciente. Entretanto, pode-se utilizar também, amostras de parasitos oriundos do isolamento de tecidos e aspirados, o que aumenta a sensibilidade de detecção. Métodos de PCR convencional, hibridização com sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucléicos, incluindo a reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa (RT-PCR) para detecção de RNA, são algumas das ferramentas que estão disponíveis para identificação do parasito. As amostras mais comumente utilizadas são fragmentos de pele ou mucosa, sangue periférico, aspirado de medula óssea ou aspirados de órgãos do sistema fagocítico-mononuclear como linfonodos e baço (GONTIJO; MELO, 2004).

No diagnóstico da LVH, a reação em cadeia polimerase convencional (PCR) é a mais utilizada, pois apresenta alta sensibilidade para a detecção de DNA de *Leishmania* em uma variedade de amostras biológicas (GONTIJO; MELO, 2004). Além disso, com a popularização destas técnicas e dos reagentes e equipamentos associados, o custo efetivo para realização desta metodologia tem propiciado sua aplicação em diversos laboratórios de diagnóstico da rede particular e pública (centros de referência).

6. RESULTADOS

A metodologia molecular mais empregada no diagnóstico da leishmaniose visceral humana é a PCR convencional, uma técnica desenvolvida em 1983 e que concedeu a Kary Banks Mullis o prêmio Nobel de química. Baseia-se na amplificação das sequências-alvos, seguidas por eletroforese em gel de agarose e/ou poliacrilamida para detecção do DNA amplificado (NOVAIS; ALVES, 2004). Para que a amplificação ocorra é necessário um par de oligonucleotídeos iniciadores específicos que reconheçam o DNA que deve ser amplificado, denominado *primers* e uma enzima, DNA polimerase, como exemplo a Taq polimerase, muito utilizada em ensaios laboratoriais. Essa reação pode ser repetida inúmeras vezes, gerando quantidade de DNA suficiente para realizar diversas análises, a partir de uma fita molde. O princípio da técnica consiste em três etapas básicas de variação de temperatura por ciclo, sendo a primeira desnaturação da fita molde, por rompimento das pontes de hidrogênio, seguida da hibridização, reconhecimento dos *primers* com o segmento específico do DNA e por último a polimerização, onde se forma novamente uma fita dupla de DNA, pela incorporação dos nucleotídeos à extremidade dos *primers* iniciadores (COSTA, 2009).

Cada ciclo é repetido em torno de 30/40 vezes e promove a amplificação da região alvo determinada conforme o anelamento dos iniciadores sintéticos de DNA, ou seja, o iniciador reconhece, por complementaridade de bases, o local de início da região do DNA a ser amplificada e fornece uma extremidade livre para a síntese da nova cadeia pela DNA polimerase (COSTA, 2009).

O fato central que faz a PCR tão útil é que todo organismo vivo possui sequências de nucleotídeos de DNA que são únicas e específicas para cada espécie. No entanto, ainda persiste a busca por uma metodologia mais confiável, mais segura, altamente específica e sensível e menos invasiva para o paciente.

Neste sentido, diversas variações da PCR têm sido desenvolvidas e validadas para uso no diagnóstico das leishmanioses. Entre estas variações tem-se a PCR-RFLP (polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição), que é baseada na amplificação de um fragmento específico do DNA e sua subsequente restrição com enzimas extraídas de bactérias chamadas endonucleases de restrição, que clivam esta molécula em sítios específicos de reconhecimento, conhecidos como sítios de restrição. Essa técnica permite a caracterização direta do parasito, pois pode ser realizada a partir de amostras clínicas, sem necessidade de isolamento prévio em cultura (VOLPINI et al., 2004; GARCIA, et al., 2006; ROMERO et al.,

2009). Além disso, por usar a estratégia de identificação de polimorfismos específicos, aumenta a especificidade da técnica de PCR associada.

Nos últimos anos, foi desenvolvido o método de PCR em tempo real, que permite realizar a quantificação do alvo durante o processo de amplificação de DNA com elevada sensibilidade e especificidade. O método utiliza sistema fluorescente em plataforma capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação, possibilitando a análise comparativa de expressão de tal gene entre as amostras logo no início da fase exponencial de amplificação, em que não há saturação da amplificação (MACKAY et al., 2007). É o avanço atual mais importante no que diz respeito à biologia molecular diagnóstica, pois, além da avaliação qualitativa da amostra, esta técnica traz, em tempo real, uma avaliação semiquantitativa (relativa) e/ou uma quantificação absoluta do DNA alvo envolvido. Além disso, esta técnica pode utilizar tanto o DNA quanto o RNA como alvo específico para análise (BACHMAN,2013).

Tendo como base os métodos moleculares previamente descritos, a maioria dos trabalhos científicos tem buscado, de forma distinta, alvos mais específicos do parasito e a utilização de amostras biológicas menos invasivas com foco em uma metodologia mais rápida e mais barata. Toz e colaboradores (2013) realizou um estudo para diagnóstico e identificação de *L. infantum* diretamente de amostras clínicas ou em amostras submetidas a isolamento do parasito. As amostras utilizadas para pesquisa de DNA do parasito foram sangue, aspirado de medula óssea e linfonodo. O estudo foi realizado buscando o desenho e padronização de sistemas de *primers* e *sondas* para identificação de *Leishmania* utilizando cepas de *Leishmania* turcas previamente identificadas pela técnica de eletroforese enzimática multilocus (MLEE). Para validação do método, foram utilizados isolados de parasitos e diferentes tipos de amostras clínicas obtidas apenas de casos confirmados de leishmaniose. A técnica empregada foi a PCR em tempo real, que teve como alvo a região transcrita do espaçador 1 (ITS1) utilizando os *primers* LITRS e L5.8S. A identificação das espécies foi realizada nos produtos amplificados pelo ITS1-PCR por análise do polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP) e confirmadas por sequenciamento. O teste identificou a espécie *L. infantum* em 72,5% e *L. tropica* em 10% no entanto em 17,5% das amostras foram observados dois picos, sendo o pico mais alto concordante com os resultados de sequenciamento em 96,96%, em termos de identificação de espécies. O ensaio de PCR ITS1 em tempo real identificou claramente as espécies de *Leishmania* em 81,58% de todas as amostras clínicas. Concluiu-se que a técnica tem alta capacidade de identificar DNA de

Leishmania em amostras biológicas mas em amostras que apresentam dois picos (amostras mistas), a capacidade do método de identificação de espécies é limitada.

Buscando utilizar amostras previamente coletadas, um estudo conduzido por Beldi e colaboradores (2017) tentou validar duas metodologias de PCR para detecção de DNA do parasito em lâminas de esfregaço de pele e aspirado de medula óssea, de pacientes portadores de leishmaniose, coradas pelo método de Giemsa. Raspados das lâminas foram obtidos e o DNA foi extraído pelo método fenol-cloroformio. Dois protocolos de PCR foram aplicados tendo o primeiro como alvo a região ITS1 utilizando os primers LITRS e L5.8S e, o segundo, genes de mini-exon usando os *primers* Fme e Rme. Os produtos amplificados foram digeridos usando as enzimas de restrição HaeIII e EaeI, os perfis foram analisados para identificação de espécies de *Leishmania* por PCR-RFLP. O estudo concluiu que as análises por PCR-RFLP confirmaram *L. infantum* como responsável pela LV e o ITS1-PCR foi significativamente mais sensível que o mini-exon-PCR (77,95% vs 67,95%). Concluiu também que lâminas coradas com Giemsa constituem uma valiosa fonte de DNA que poderia ser usada não só para diagnóstico de leishmaniose, mas também para retrospectiva de estudos epidemiológicos (BELDI et al., 2017).

Trajano-Silva e colaboradores (2017) realizaram um estudo objetivando padronizar e avaliar a inclusão de um controle de qualidade em um protocolo quantitativo de PCR em tempo real (qPCR) para detecção de DNA de *L. infantum*, permitindo o rastreamento de falsos positivos, visto que uma limitação desse método é poder produzir resultados falsos positivos devido ao armazenamento incorreto e perda de DNA durante a etapa de extração. Todos os pacientes incluídos no estudo foram submetidos a um teste imunológico para detecção de anticorpos, um teste molecular (qPCR) e alguns pacientes com suspeita de LV ainda foram submetidos a teste parasitológico que incluiu uma biopsia aspirativa da medula óssea. O teste duplo de qPCR foi desenvolvido através da combinação dos *primers* de *L. infantum* (LINF1B) e G3PD1 para a detecção simultânea do kDNA de *L. Infantum* e o gene G3PDH de mamíferos (controle interno), por meio do ensaio Taqman. Para validação da metodologia *duplex* qPCR, as amostras submetidas foram também analisadas por outras duas metodologias padrões (biopsia de medula óssea e o teste imunocromatográfico) e a concordância entre os testes validavam a reação. Além disso, a positividade do *duplex* era admitida quando a curva de amplificação não ultrapassasse o limiar do ciclo 36 da qPCR. O estudo concluiu que o novo *duplex* indicou um bom potencial para a detecção precisa, rápida e confiável do DNA de *L. infantum*, quando aplicado como complemento às ferramentas de diagnóstico clássicas já

disponíveis, especialmente em centros de referência de saúde ou pesquisa (TRAJANO-SILVA et al., 2017).

Outro estudo envolvendo PCR em tempo real, utilizando o sistema SYBR Green, visando a região conservada de minicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA) foi capaz de diferenciar os subgêneros de *Leishmania* em amostras clínicas. A realização desta distinção é importante entre os isolados de *Leishmania* dada sua importância para a condução de prognóstico, terapia e epidemiologia apropriados. O estudo também concluiu que a análise das curvas de dissociação térmica visando a região de minicírculos do kDNA conservado é capaz de fornecer um método rápido e confiável para identificar os principais agentes etiológicos das leishmanioses cutânea e visceral em regiões endêmicas do Brasil (PITA-PEREIRA, D. et al., 2012).

Visando o uso de amostras menos invasivas, o estudo conduzido por Motazedian e colaboradores (2008) analisou amostras de urina em pacientes com suspeita de LVH. A técnica empregada foi a PCR convencional utilizando primers específicos RV1 e RV2 que possui o kDNA como alvo. Neste sentido, o DNA total foi extraído da urina dos pacientes e os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose e detectados por ultravioleta após marcação com brometo de etídio. Este método mostrou ser eficaz em pacientes imunocompetentes, pacientes não tratados, com ou sem insuficiência renal e pacientes tratados atuando como um controle de cura no estudo.

Com este mesmo foco, Costa Lima Junior e colaboradores (2018) avaliaram se o DNA de amastigotas de *L. infantum* poderia ser detectado na urina de pacientes infectados, utilizando a PCR convencional com os primers ACTIN-F e ACTIN-R. As amostras positivas foram submetidas à outra PCR com os pares de oligonucleotídeos LITSR e L5.8S. Estes iniciadores amplificaram a região ITS1. Para caracterização das espécies de *Leishmania*, os amplicons dessas PCRs foram submetidos a RFLP utilizando a enzima de restrição Hae III. Em seguida os produtos de PCR-RFLP foram analisados por eletroforese em gel de agarose de alta resolução. Baseado no PCR-RFLP, o agente infeccioso em todas amostras foi identificado como *L. infantum*, este foi o primeiro estudo que identificou amastigotas viáveis na urina dos pacientes brasileiros, logo sugere-se a viabilidade de amostras de urina para diagnóstico da LV.

Pessoa-e-Silva, et al., (2016) realizaram um estudo para detecção de DNA de *L. infantum* por PCR em tempo real (qPCR) em amostras de urina e observou que há uma rápida depleção do DNA do parasito na urina após o tratamento (antimoniato de meglumina). Esse

dado torna o método uma abordagem interessante na investigação da progressão da doença e na detecção precoce e precisa da infecção, bem como o acompanhando de sucesso ou não do tratamento (prognóstico).

Estes estudos mostraram resultados promissores e concluíram que os métodos baseados em biologia molecular possuem alta sensibilidade e especificidade. Essa abordagem pode servir como uma ferramenta valiosa no diagnóstico da LV. No entanto, resultados confiáveis dependem de uma verificação em condições de campo e com uma amostragem relativamente maior, além de variabilidades como área endêmica, o tipo de amostra, o alvo do DNA utilizado para amplificação e até o método de extração do DNA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; PESSOA-E-SILVA et al., 2016).

Apesar dos avanços tecnológicos, os métodos de PCR e suas variações também podem apresentar algumas limitações, como resultados falso-positivo decorrentes de contaminação e resultados falso-positivo devido a presença de inibidores da PCR. Esses problemas podem ser contornados melhorando as condições de realização das técnicas, para reduzir os riscos de contaminação. O uso de amostras menos invasivas como a urina, apresentado em alguns estudos acima, mostrou ser uma alternativa interessante no entanto ainda precisa de alternativas para uma coleta e método de preservação eficaz da amostra.

Outro método que também vem sendo estudado é a amplificação isotérmica mediada por *loop* para o diagnóstico da LV. Diferentemente da PCR, o fragmento alvo amplificado por LAMP (*Loop-mediated Isothermal Amplification*) não apresenta apenas uma região específica para atuação de um par de iniciadores específicos. Nessa técnica os iniciadores reconhecem quatro ou seis regiões específicas do gene. A identificação dessas seis regiões alvos presentes no ácido nucleico se dá pela hibridização de dois ou três pares de iniciadores. Cada par de iniciador hibridiza e direciona a enzima DNA polimerase para síntese e posterior deslocamento da fita (NOTOMI et al., 2000). Por se tratar de um método que trabalha em condições isotérmicas é considerada uma técnica molecular simples, devido à praticidade e à detecção do gene de interesse.

Verma e colaboradores (2013) aplicaram o ensaio LAMP usando o sistema SYBR Green para detecção a olho nu de DNA de *Leishmania* em amostras de pacientes com leishmaniose visceral. Foram utilizadas amostras de sangue, aspirados de medula e biópsia tecidual. O recém-desenvolvido método LAMP é um método simples de amplificação de DNA baseado em um *design* único de *primers* e não requer uma etapa de desnaturação durante a amplificação. O método apresenta alta especificidade, é rápido, simples e uma

econômica ferramenta de diagnóstico em comparação com o ensaio de PCR. Contudo, segundo os autores, os estudos ainda são limitados e precisam ser ampliados para validar a ferramenta. O DNA do parasito foi detectado em 53 amostras de sangue de 55 casos, apresentando uma sensibilidade de 96,4% e em todas amostras de aspirados de medula apresentando uma sensibilidade de 100%, enquanto a microscopia foi positiva em 62% dos casos. Além disso o ensaio foi negativo em 67 de 68 amostras de controle com uma especificidade de 98,5%. Os parasitos foram detectados em todos os casos por qPCR baseada em SYBR Green, o ensaio LAMP foi positivo para DNA de *L. donovani* e negativo para DNA de outras *Leishmanias* spp., sendo que foram analisadas *L. infantum*, *L. tropica* e *L. major* (VERMA et al., 2013).

Apesar de apresentar poucos estudos utilizando o ensaio LAMP para diagnóstico da leishmaniose essa técnica é uma metodologia de baixo custo quando comparada com a PCR, rápida, sensível e específica, mostrando ser uma metodologia ideal para o diagnóstico.

De acordo com a revisão realizada nos trabalhos selecionados com foco em técnicas moleculares aplicadas à LV, compilamos a Tabela 1 que sumariza os principais resultados obtidos nos diferentes trabalhos. De forma geral, pode-se concluir que a técnica de qPCR oferece várias vantagens em relação à PCR convencional, incluindo processamento mais rápido, maior sensibilidade e menor risco de contaminação, principalmente quando o sistema Taqman é associado (inclusão da sonda). No entanto, esta metodologia apresenta como desvantagem, ainda, o elevado custo. Apesar disso, o padrão-ouro para o diagnóstico da LVH ainda tem sido tradicionalmente a detecção de formas amastigotas em aspirado da medula óssea ou do baço, mas este é um procedimento invasivo que acarreta o risco de complicações ao paciente que já se encontra debilitado pela doença. Dessa maneira, o avanço biotecnológico com o desenvolvimento de metodologias moleculares mais simples, rápidas e baratas tendem a colocar, de maneira muito clara e objetiva, a PCR e suas variantes como ferramenta fundamental no diagnóstico da LVH.

Referência	Método utilizado	Tipo de amostra	Principais resultados	Limitações
Motazedian et al., 2008	PCR convencional	Urina	Detecção de <i>L. infantum</i> em 29/30 amostras; 100% de especificidade	Ausência de grandes estudos epidemiológicos
Pita-Pereira, et al., 2012	qPCR- SYBR Green	Sangue, medula óssea, biópsia de lesão e saliva de flebotomíneos	Foi capaz de diferenciar as espécies <i>L. infantum</i> , <i>L. brasiliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> e <i>L. shawi</i>	Elevado custo
Toz et al., 2013	ITS1-PCR em tempo real	Sangue, medula óssea e linfonodo	Detecção de <i>L. infantum</i> em 81,58% das amostras	Baixa especificidade
Verma et al., 2013	LAMP	Sangue, medula óssea e pele	97% de sensibilidade para <i>L. donovani</i> e 98,5% de especificidade	Ausência de grandes estudos epidemiológicos
Pessoa-e-Silva et al., 2016	qPCR- SYBR Green	Urina	Detecção de <i>L. infantum</i> em amostras de pacientes tratados ou não	Baixa sensibilidade
Trajano- Silva et al., 2017	Duplex qPCR, teste parasitológico e imunocromatografico	Sangue, medula óssea	Houve concordância entre o duplex e os testes (técnicas de referência) de 81,7%.	Resultados falso-positivo

Beldi et al., 2017	ITS1-PCR Mini-exon-PCR PCR-RFLP	Medula óssea e pele (laminas coradas com Giemsa)	Houve confirmação por PCR-RFLP da <i>L. infantum</i> como responsável pela LV. ITS1-PCR apresentou mais sensível que mini-exon PCR. Concluiu que lâminas corada com Giemsa constituem uma valiosa fonte de DNA, para identificação da espécie e retrospectiva de estudos epidemiológicos.	Ausência de grandes estudos epidemiológicos
Costa Lima Junior et al., 2018	PCR convencional	Cultura de urina	Houve detecção de DNA de <i>Leishmania</i> em 37% das amostras; 100% de especificidade	Dificuldades técnicas durante a coleta e preservação da amostra

Tabela 1: Descrição sucinta dos estudos utilizados nesta revisão. Métodos moleculares utilizados, tipos de amostra biológica, principais resultados e limitações dos estudos avaliados.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho evidenciou como a existência de um diagnóstico rápido e eficaz para o controle da doença ainda não é uma realidade. Além disso, devido às dificuldades encontradas no diagnóstico da LV em áreas endêmicas, é necessário o emprego de técnicas simples, de baixo custo, de fácil execução e que apresentem elevada sensibilidade e especificidade. A PCR tem se mostrado ser uma ferramenta sensível, específica e útil para a detecção de *Leishmania* spp. em amostras clínicas de humanos naturalmente infectados. Além disso, PCR-RFLP apresenta maior confiabilidade e diagnóstico espécie - específica. A PCR em tempo real também tem se destacado e parece ser uma metodologia promissora para estudos de quantificação da carga de DNA de *Leishmania*, visto que as técnicas até então utilizadas são laboriosas, pouco sensíveis ou pouco específicas.

Entretanto, tendo em vista o risco na obtenção do aspirado de medula óssea e baço para o diagnóstico considerado padrão ouro, faz-se necessária a busca de amostras menos invasivas, que provoquem menos obstáculos ao diagnóstico e menos sofrimento aos pacientes.

8. REFERÊNCIAS

- ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis world wide and global estimates of its incidence. PLoS ONE 10 (5), e35671. 2012. 12 p.
- ASSIS TSM. et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. Epidemiol. Serv. Saúde. Jun 2008;17(2):107-16
- BACHMAN J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). Methods Enzymol. 2013;530(1):67-74
- BELDI, N. et al. Molecular Characterization of Leishmania Parasites in Giemsa-Stained Slides from Cases of Human Cutaneous and Visceral Leishmaniasis, Eastern Algeria. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2017. 09 p. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28301305>>. Acesso em: Set/2018.
- CARLI, Geraldo Atílio. Parasitologia Clínica seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das parasitoses Humanas. 2ª ed. São Paulo. Ed. Atheneu. 2011.
- COSTA, Ronaldo de Jesus. Técnica de Biologia Molecular: PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Disponível em: <<http://www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/8577/tecnica-de-biologia-molecular-pcr-reacao-em-cadeia-da-polimerase>>. Acesso em: Jan/2019.
- CUPOLILLO, E. Avanços dos Estudos Moleculares de Leishmania (Leishmaniachagasi) Aplicados ao Diagnóstico de LV no Brasil. In: Consulta de Expertos OPS/OMS Sobre Leishmaniasis Visceral en Las Américas, p.57-62, 2005.
- GALVÃO, Taís Freire; PEREIRA, Mauricio Gomes. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. Epidemiologia e serviços de saúde. Brasília, nº 23, vol. 1, p.183-184, jan -mar. 2014.
- GARCIA, A. L. et al. American Tegumentary Leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. Infection, Genetics and Evolution, Amsterdam, v. 5, p. 109-116, 2005
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Revista Brasileira de Epidemiologia, São Paulo, v. 7, n. 3, p.338-349, 2004 Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2004000300011>. Acesso em: Set/2018.
- JUNIOR, M. S. C. L. et al. Isolation and molecular characterization of Leishmania infantum in urine from patients with visceral leishmaniasis in Brazil. Acta Tropica, 2018. 04 p. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29221850>>. Acesso em: Set/2018.
- Mackay, I. M., Mackay, J.F., Nissen, M.D., Sloots, T.P. (2007). Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries in Mackay, p.1-40, I.M. (Ed.), Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization. Caister Academic Press Norfolk, UK

MAURICIO I. L.; STOTHARD J. R. ; MILES M. A. The strange case of Leishmania chagasi. *ParasitolToday*, 2000; 16: 188-9. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10782075> >. Acesso em: Set/2018.

MCMAHON-PRATT D and ALEXANDER J. 2004. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *ImmunolRev* 201: 206–224.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO de VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Leishmaniose visceral grave: normas e condutas. Brasília, 62p., 2006a. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leishmaniose_viscer_al_grave_normas.pdf>. Acesso em: Set/2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO de VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A: Normas e Manuais Técnicos. Brasília, 122p., 2006b. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer_al.pdf>. Acesso em: Set/2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento da Co-infecção Leishmania-HIV. Série A: Normas e Manuais Técnicos. Brasília, 72p., 2004. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_pacientes_leishmania.pdf>. Acesso em: Set/2018.

MOTAZEDIAN, M. et al. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2008. 04 p. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17931819> >. Acesso em: Set/2018.

NOAZIN, Sassan et al. First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. *Vaccine* 26, 6759–6767. 2008.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, vol 28, n. 12, e63, 2000.

NOVAIS, C.M; ALVES, M.P. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. Edição nº 33. 2004

NUNO MARQUES, S, et al. Leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana - Na era da terapêutica anti-retrovirídica de alta eficácia. *Acta Médica Portuguesa*, Lisboa, v. 20, p.291-298, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE/ ORGANIZAÇÃO PAN- AMERICANA DE SAÚDE. Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2018. Disponível em: < <https://www.paho.org/leishmaniasis> >. Acesso em: Set/2018.

PESSOA-E-SILVA, R. et al. Evaluation of urine for *Leishmania infantum* DNA detection by real-time quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods* 2016. 08 p. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27713020> >. Acesso em: Set/2018.

PITA-PEREIRA, Daniela et al. SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniases. *BioMed Central*. 2012. 09 p. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22240199> >. Acesso em: Set/2018.

ROMERO, G. A. S. et al. Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for *Leishmania* detection using skin biopsy imprints on filter paper. *Acta Tropica*, Amsterdam, v 109, p. 74–77, 2009.

TRAJANO-SILVA, LAM et al. Standardization and evaluation of a duplex real-time quantitative PCR for the detection of *Leishmania infantum* DNA: a sample quality control approach. *Rev Soc Bras Med Trop* 50(3):350-357. 2017. 08 p. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822017000300350&script=sci_abstract >. Acesso em: Set/2018.

TOZ, S. O. et al. A Real-Time ITS1-PCR Based Method in the Diagnosis and Species Identification of *Leishmania* Parasite from Human and Dog Clinical Samples in Turkey. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2013. 08 p. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675543> >. Acesso em: Set/2018.

VERMA, S. et al. Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2013. 06 p. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23433714> >. Acesso em: Set/2018.

VOLPINI, A. C. et al. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L.* (*Leishmania*) *amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, Basel, v. 90, p. 31-37, 2004.

World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Última revisão: Março 2018.