

ALVOS MOLECULARES UTILIZADOS EM PCR PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA

MOLECULAR TARGETS USED IN PCR FOR THE DIAGNOSIS OF HUMAN VISCERAL LEISHMANIASIS

Maria Almerice Lopes da Silva, Rafael Acioli Medeiros, Sinval Brandão-Filho, Fábio Lopes de Melo, Zulma Medeiros

E-mail da autora para correspondência: almerice_lopes@yahoo.com.br

Recebido em 10/06/2010, Aceito em 29/07/2010

RESUMO: A dificuldade do diagnóstico do calazar humano traz a necessidade do emprego de ferramentas sensíveis e específicas. Nesse contexto, as abordagens em PCR vem se destacando, com uma ampla gama de alvos e iniciadores já padronizados. Porém, há uma carência de dados sistematizados que apontem qual o melhor alvo e iniciadores a serem utilizados em determinadas regiões e em situações específicas. Assim, este trabalho almejou descrever as informações disponíveis na literatura para auxiliar na escolha dos sistemas de PCR pelos profissionais de saúde na rotina dos serviços de laboratório. A identificação dos trabalhos foi feita por busca em bases de dados, que após leitura dos resumos/abstracts foram inclusos nessa revisão. O artigo aponta quais as vantagens e desvantagens dos alvos moleculares e iniciadores, oferecendo informações para a escolha dos alvos e iniciadores adequados segundo a necessidade do serviço pelos profissionais.

Palavras-chave: diagnóstico, leishmaniose visceral, reação em cadeia da polimerase, saúde pública.

ABSTRACT: The difficulty for diagnosing human leishmaniasis brings the need of using sensitive and specific tools. In this context, PCR approaches have been increasing, with a wide range of targets and primers already standardized. However, there is a lack of standardized data that suggest what is the best target and primers to use in certain regions and in specific situations. Thus, this work aims at describing the information available in the literature to assist in the selection of PCR systems for health professionals in routine laboratory services. The identification of the papers was provided by research in databases; after the reading of summaries the exemplars selected were included in this review. The article points out the advantages and disadvantages of targets and primers, providing information for the choice of appropriate targets and primers according to the needs of the work developed by the professionals.

Keywords: diagnosis, visceral leishmaniasis, polymerase chain reaction, public health.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma doença sistêmica que pode ser fatal se não tratada. No continente americano, o Brasil apresenta a maior endemicidade, com cerca de 97% de todos os casos americanos. A região Nordeste brasileira possui 82,5% das notificações brasileiras (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

No diagnóstico laboratorial, a demonstração de formas amastigotas no aspirado de medula óssea, baço, linfonodos ou fígado é considerado o padrão ouro. Porém, são procedimentos invasivos, possuem sensibilidade variável e contraindicações. Em relação aos testes sorológicos disponíveis a (imunofluorescência indireta (IFI), teste de aglutinação direta (DAT) e a imunocromatografia utilizando o antígeno rK39) possuem limitações, tanto na sensibilidade quanto na especificidade (SANDAR; RAIA, 2002; GONTIJO; MELO, 2004; DOURADO et al., 2007). A pesquisa de antígenos em urina pela aglutinação em látex (KAtex) tem sido apontada como uma ferramenta promissora, mesmo nas difíceis condições de campo (ATTAR et al., 2001; GARCÍA-GARCÍA et al., 2006; KALLEL et al., 2007; GAVGANI; KHADEMVATAN; GHAZANCHAEI, 2008).

A PCR tem sido vista como um diagnóstico alternativo quando o paciente apresenta como hipótese diagnóstica calazar ou coinfeção e microscopia e sorologia são negativas ou indeterminadas (ALAM et al., 2009). Os ensaios já foram padronizadas com diversos fluidos corporais, como sangue,

aspirado de medula óssea, soro e urina (ANDRESEN et al., 1997; FISA et al., 2008a). Vários sistemas baseados em PCR têm sido desenvolvidos para *Leishmania*, e muitas sequências alvo já foram identificadas, como também um grande número de oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) desenhados.

Assim, o objetivo dessa revisão é sistematizar as informações, auxiliando profissionais e serviços de saúde na implantação dessa ferramenta na rotina de diagnóstico. A identificação dos artigos foi feita por busca nas bases de dados LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), MEDLINE (National Library of Medicine, Estados Unidos), PUBMED (National Institutes of Health) e SCOPUS, reunindo publicações em inglês, espanhol e português no período de 1999 a 2009. Os descritores utilizados foram: "leishmaniose visceral" ou "visceral leishmaniasis" e "PCR". Foram excluídos os trabalhos que não objetivassem o diagnóstico por PCR para LV humana. Assim, a pesquisa resultou em 269 artigos. Após leitura de seus abstracts/resumos, 84 artigos foram selecionados para a elaboração deste artigo.

Os iniciadores citados foram submetidos à análise de homologia utilizando-se o servidor primer-BLAST 2.0 ("Basic Local Alignment Search Tool") do National Center for Biotechnology Information (NCBI) da biblioteca Nacional de Medicina do NIH (National Institute of Health), Maryland, EUA. No quadro 1 são apresentados os iniciadores, com respectivas citações bibliográficas, seus

alvos moleculares e primer-BLAST, que são citados neste trabalho.

Quadro 1 – Alvos moleculares e iniciadores estudados para o diagnóstico da LV humana

<i>Iniciadores</i>	<i>Autores</i>	<i>Alvo molecular</i>	<i>Análise pela ferramenta primer-BLAST</i>
RV1: 5'-CTTTTCTGGTCCC GCGGGTAGG-3' RV2: 5'-CACCTGGCCTATTTTACACCA-3'	LE FICHOUX et al. (1999)	Minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA)	<i>L. infantum</i> , <i>L. donovani</i> e <i>L. major</i> .
AJS31: 5'-GGGGTTGGTGAAAATAGGGCCGG-3' DeBY: 5'-CCAGGTTCCCGCCCCGGAG-3'	SMYTH et al. (1992)		<i>Leishmania SP</i>
LdI: 5'-AAATCGGCTCCGAGGCGGAAAC-3' e 5'-GGTACTCTATCAGTAGCAC-3'	SALOTRA et al. (2001)		<i>L. donovani</i>
MC1: 5'-GTTAGCCGATGGTGGTCTTG-3' MC2: 5'-CACCCATTTTCCGATTTTG-3'	CORTES et al. (2004)		<i>L. infantum</i> , <i>L. chagasi</i> , <i>L. donovani</i> e <i>Caenorhabditis elegans</i>
R221: 5'-GGTTCCTTTCCTGATTTACG-3' R332: 5'-GGCCGGTAAAGGCCGAATAG-3' R223: 5'-TCCCATCGCAACCTCGGTT-3' R333: 5'-AAAGCGGGCGCGGTGCTG-3'	VAN EYS et al. (1992)	Subunidade menor do ribossomo (SSUrRNA)	<i>Trypanosomatidae</i> sp
18S-L-F: 5'-CGTAGTTGAACTGTGGGCTGTGC-3' 18S-L-R: 5'-ACTCCCGTGGTCTTGTCTTTGAA-3'	DEBORGGRAEVE et al. (2008)		<i>Trypanosomatidae</i> sp
LITSR: 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3' L5.8S: 5'- TGATACCACTTATCGCACTT-3'	EL TAIL et al. (2000)	Espaçador Transcrito Interno (ITS)	<i>Trypanosomatidae</i> sp
LITSV: 5'-ACACTCAGGTCTGTAAAC-3' L5.8SR: 5'-AAGTGCATAAGTGGTA-3'			
Hsp70sen: 5'-GACGGTGCCTGCCTACTTCAA-3' Hsp70ant: 5'-CCGCCATGCTCTGGTACATC-3'	GARCIA et al. (2004)	Gene HSP70	<i>Leishmania sp</i> , <i>Trypanosoma sp.</i>
LDS: 5'-GCGACGACAAGCCCATGATT-3' LDK: 5'- GCGTCGGCTCGTTGATGATG-3'	ARORA et al. (2008)		<i>Trypanosomatidae</i> sp.
SG1: 5'-GTCTCCACCGAGGACCTACCGA-3' SG2: 5'-TGATGTAGCCGCCCTCCTCGAAG-3'	GUERBOUJ et al. (2001)	Gene gp63	<i>Leishmania SP</i> , <i>Crithidia fasciculata</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Micromonas sp.</i> ,

			<i>Streptomyces</i> sp.
PDD1: 5'-TCGGTGAGGTCCTCGGTGGAGAC-3'			<i>L. infantum</i> , <i>L. braziliense</i> , <i>Burkholderia gluma</i>
PDD2: 5'-CTTCGAGGAGGGCGGCTACATCA-3'			
TV255: 5'-AGTACGGCTGCGACACCTTGGAG-3'	TUPPERWAR et al. (2008)		<i>Leishmania</i> sp, <i>Xylanimonas cellulositytica</i> , <i>Corynebacterium efficiens</i>
TV256: 5'-GTTCCGGCCCCACGGCATCACC-3'			
K26f: 5'-ACGAAGGACTCCGCAAAG-3'	HARALAMBOUS et al. (2008)	Gene K26	Complexo <i>L. donovani</i>
K26r: 5'-TTCCCATCGTTTTGCTG-3'			
Ext: 5'-AATTCGACGATCACGAGGTC-3'	FISA et al. (2008b)	Fragmentos gênicos	<i>L. infantum</i>
E2b: 5'-CGACTCGGTTGGCACACTG-3'			
P-1: 5'-ACGAGGTCAGCTCCACTCC-3'	PIARROUX et al. (1993)		<i>L. infantum</i>
P-2: 5'- CTGCAACGCCTGTGTCTA CG-3'			
Fme: 5'-TATTGGTATGCGAACTTCCG-3'	MARFURT et al. (2003a)	Gene do mini-exon	<i>Trypanosomatidae</i> sp.
Rme: 5'-CAGAACTGATACTTATATAGCG-3'			
S-1629: 5'-gggaattCAATAT/AAGTACAGAACTG	KATAKURA et al. (1999)		Múltiplos alvos
S-1630: 5'- ggaagcTTCTGTACTT/ATATTGGTA			

ALVOS MOLECULARES E INICIADORES

Os ensaios baseados em PCR constituem atualmente a principal abordagem no diagnóstico molecular. Além da pequena quantidade necessária de material biológico, outro ponto importante da PCR é a diferenciação dos agentes infecciosos, que pode ser feita pela análise de polimorfismo dos alvos (BHATTARAI et al., 2009). Os alvos são importantes pelas suas sensibilidade e especificidade, características do ensaio que são intrínsecas a escolha dos iniciadores, que podem resultar falso positivos ou falso negativos (DENIAU et al., 2003).

1 Minicírculo do cinetoplasto

O DNA do cinetoplasto (kDNA, do inglês *kinetoplast*) representa 20-25% do DNA do parasito e consiste em uma rede de moléculas circulares, concatenadas, divididas em maxicírculos e minicírculos (TELLERIA et al., 2006). São cerca de 50 maxicírculos (com 20.000 a 35.000 pb (pares de base)), que contêm genes que codificam proteínas mitocondriais e o RNA ribossomal (rRNA), enquanto os minicírculos são no número de 10.000 a 20.000, com sequências de 500 a 2.500 pb (CORTES, 2008). Diante dos alvos que serão descritos nesta revisão, pode-se dizer que o minicírculo kDNA é o alvo mais

estudado e aplicado nas pesquisas moleculares para o diagnóstico de calazar humano. Sua vantagem está no fato do grande número de cópias por célula.

Os iniciadores desenhados por Le Fichoux et al. (1999) foram os mais aplicados na amplificação do minicírculo do kDNA (Quadro 1). A região amplificada é a LT1, que apresenta uma sequência de 145 pb, e os sistemas desenvolvidos já foram aplicados com sucesso na identificação de *Leishmania* em amostras de medula, sangue, soro e urina, de pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos (ATTAR et al., 2001; FISSORE et al., 2004; MARY et al., 2004, 2006; KONGKAEW et al., 2007; FAKHAR et al., 2008; MOTAZEDIAN et al., 2008; JUNIOR et al., 2009). Os bons resultados para esses iniciadores foram obtidos tanto utilizando técnicas convencionais de PCR como a PCR em Tempo Real (MARY et al., 2004; GERAMIZADEH; FAKHAR; MOTAZEDIAN, 2006; KONGKAEW et al., 2007; SUKMEE et al., 2008; VILLINSKIA et al., 2008). Os sistemas apresentaram valores de detecção de 0,001 parasito/mL, identificando DNA de *Leishmania* em portadores assintomáticos, quando as técnicas convencionais de diagnóstico falharam, indicando uma boa correlação entre os níveis de parasitemia e o estado clínico dos pacientes (MARY et al., 2004; FAKHAR et al., 2008). Porém, sistemas que produzem amplicons com baixo número de pb podem apresentar erros na interpretação dos resultados, devido ao tamanho próximo ao dos dímeros de iniciadores.

O par de *primers* AJS31/DeBY (SMYTH et al., 1992) produz um fragmento de 805 pb do kDNA para *L. infantum* e *L. donovani*, e 780 pb para *L. chagasi* (LAMBSON; SMYTH; BARKER, 1999, 2000; MONROY-OSTRIA; HERNANDEZ-MONTES; BARKER, 2000; MORALES et al., 2001; RODRIGUEZ et al., 2005; BOTILDE et al., 2006). Ao se aplicar enzimas de restrições, Morales et al., 2002, distinguiram entre recidivas e reinfecções pós-tratamento na coinfeção por HIV/*Leishmania*. Resultados significativos também foram obtidos com o uso dos iniciadores Ld I (SALOTRA et al., 2001), que amplificam um fragmento de aproximadamente 600 pb, com uma detecção de até 1 fg de DNA de *L. donovani* (SREENIVAS et al., 2004; MAURYA et al., 2005; SHARMA et al., 2010). A especificidade dos iniciadores foi avaliada com DNA de *L. major*, *L. tropica*, *Plasmodium* spp., *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, onde não se observou amplificação (SALOTRA et al., 2001). Em relação aos iniciadores MC1/MC2, o produto da amplificação é uma banda de 447 pb (CORTES et al., 2004). Diante dos ensaios com amostras biológicas, esses iniciadores mostraram-se específicos para as espécies *L. donovani* e *L. infantum* (CORTES et al., 2004, 2006; ROLÃO et al., 2004).

Muitos outros iniciadores foram desenvolvidos nesta última década para pesquisa de DNA de *Leishmania* utilizando como alvo o kDNA (BRENIÈRE et al., 1999; MARTIN-SANCHEZ et al., 2001; ANDERS et al., 2002; KYRIAKOU et al., 2003; MARFURT et al., 2003a; DISCH et al., 2006; BRUSTOLONI et al., 2007; ASSIS et al.,

2009). Esse alvo possui uma considerável heterogeneidade o que pode acarretar em perda da acurácia do ensaio, o que não é observado em outros alvos moleculares (MARY et al., 2004). Na aplicação de enzimas de restrição ao kDNA (PCR-RFLP), essa heterogeneidade dificulta a construção de padrões por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) devido ao grande número de fragmentos restritos, restringindo a utilização dos iniciadores entre isolados próximos ou apenas permite a identificação de grupos ou isolados de mesma área.

2 DNA ribossômico

O DNA ribossômico (rDNA) possui unidades repetidas ou em *tandem* dentro da região nucleolar. Nas células eucarióticas, há cerca de 100 a 500 cópias do gene rDNA no genoma nuclear, onde cada unidade de transcrição, é composta de uma região promotora líder, o espaçador transcrito externo (ETS – *External Transcribed Spacer*), uma região codificadora do rRNA 18S, um espaçador não codificante interno (ITS-1), uma região codificadora de rRNA 5,8S, um outro espaçador não codificante interno (ITS-2), uma região codificadora de rRNA 28S e, finalmente, um segmento intergênico espaçador não transcrito, IGS (MATEUS et al., 2006).

Apesar do baixo número de cópias do rDNA em comparação ao kDNA, suas subunidades são bem exploradas no desenvolvimento de ferramentas moleculares para diagnóstico da infecção por *Leishmania*, sendo esse alvo um dos mais explorados na identificação de espécies.

2.1 Subunidade menor do ribossomo

Os genes codificantes do RNA presente na subunidade menor do ribossomo (SSU-rRNA) apresentam múltiplas cópias e são bem conservados para o gênero em estudo, permitindo o desenho dos iniciadores. Esse alvo não apresenta o problema de heterogeneidade do kDNA, podendo a informação discriminatória do segmento variável ser acessada por sequenciamento ou por hibridação, produzindo resultados positivos pela PCR, independente da linhagem, grupo ou espécie (FLOETER-WINTER, 2010). Uma desvantagem na aplicação desse alvo é que relações filogenéticas não puderam ser esclarecidas (ULIANA et al., 1991).

Os iniciadores R221, R332, R223 e R333 apresentados por Van Eys et al. (1992) são os mais descritos na amplificação de regiões do SSU-rRNA, produzindo fragmentos de 600-650 pb dependendo da espécie de *Leishmania* (SCHÖNIAN et al., 2003). Os estudos apontam um desempenho satisfatório desses iniciadores nas PCRs desenvolvidas, ao serem comparados com a pesquisa direta do parasito e sorologia (PIZZUTO et al., 2001; DONCKER et al., 2005; STARK et al., 2006; ANTINORI et al., 2007; SALAM et al., 2009), assim como no monitoramento pós-terapêutico de pacientes imunocomprometidos (LACHAUD et al., 2000, 2001). A Nested-PCR utilizando os pares R221/R332 na primeira reação e R223/R333 na segunda reação detectou 0,01 promastigota (CRUZ et al., 2002). Esta abordagem foi superior às técnicas convencionais em pacientes coinfectados por HIV/*Leishmania* (CRUZ et al.,

2002) e em crianças imunocompetentes (CRUZ et al., 2006).

Recentemente, Deborggraeve et al. (2008), desenharam os iniciadores senso 18S-L-F e antissenso 18S-L-R, que reproduzem um fragmento de 115 pb do gene 18S rRNA. A PCR apresentou uma detecção de até 10 fg de DNA, não sendo observadas reações cruzadas com *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Schistosoma mansoni*, *Trypanossoma brucei gambiense* e *Trypanossoma cruzi*. Bhattarai et al. (2010) aplicaram esse sistema na investigação de pacientes assintomáticos que moravam no mesmo domicílio de casos confirmados de calazar, alcançando um excelente desempenho da ferramenta molecular em comparação ao DAT no diagnóstico da infecção por *Leishmania*.

Na análise pela ferramenta primer-BLAST, todos os iniciadores citados para o SSUrRNA podem também amplificar esse alvo em outros tripanossomatídeos, produzindo bandas de tamanho similar aos amplificados com o gênero *Leishmania*. Tal fato pode indicar um problema no uso desse ensaio em áreas coendêmicas para esses parasitos, podendo resultar, por exemplo, em reação cruzada com doença de Chagas.

2.2 Espaçador interno transcrito

O espaçador interno transcrito (ITS) é uma região não codificante encontrada no SSUrRNA, onde o ITS-1 é delimitado pelos genes 18S e 5.8S, enquanto o ITS-2 pelos genes 5.8S e 28S. Esse espaçador tem sido descrito na identificação de espécies de *Leishmania* e de suas linhagens por meio da

PCR-RFLP (SCHÖNIAN et al., 2003). Os pares de iniciadores mais utilizados na amplificação da região ITS são LITSR e L5.8S, que reproduz o ITS-1 com produto de 300 – 350 pb, e LITSV e L5.8SR, para o ITS-2 com produto de 700 pb (EL TAIL et al., 2000; SCHÖNIAN et al., 2003). A ITS-1 PCR apresentou bons resultados em amostra de sangue, aspirado de medula ou esfregaços de lâminas coradas com Giemsa (EL TAIL et al., 2000; BADER et al., 2005; KAZEMI-RAD et al., 2008; ALAM et al., 2009; AMRO et al., 2009). Esses iniciadores parecem ser específicos para o gênero *Leishmania*, pois não produz bandas frente a DNA de *T. cruzi*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Typhophywn terrestre* e *Microsporium audouini* (EL TAIL et al., 2000). Porém, utilizando a ferramenta primer-BLAST, observa-se que esses iniciadores podem amplificar regiões de outros tripanossomatídeos, inclusive *T. cruzi*, com produtos que variam de 300-760 pb de tamanho.

3 Outras regiões-alvo

Os microssatélites são *loci* polimórficos presentes no DNA nuclear amplamente distribuídos nas células eucarióticas e que apresentam sequências simples repetitivas (SSR), composta por 1 a 4 nucleotídeos, que geralmente não excedem 200 pb (BECKMAN; WEBER, 1992). Rossi et al. (1994), identificaram 3 sequências de microssatélites no genoma de *Leishmania*: (CA)_n, (GAC)_n e (GGT)_n. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), a utilização dessa região em PCR oferece uma completa cobertura do genoma, sendo úteis para mapeamento genético e

físico de genomas, identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações. Botilde et al. (2006) compararam o poder discriminatório em nível de zimodema para *L. infantum* de quatro métodos moleculares: kDNAPCR-RFLP, cpb e gp63PCR-RFLP, tipagem de microssatélite multilocus (MLMT) e amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD). O polimorfismo nos microssatélites é simples e facilmente detectado pela PCR, com boa reprodutibilidade e discriminação, podendo ser usado para diferenciar relapsos ou reinfeção em pacientes com múltiplos episódios de LV (BULLE et al., 2002; OCHSENREITHER et al., 2006; KUHLS et al., 2007; SERIDI et al., 2008).

As *Heat Shock Proteins (HSPs)*, ou proteínas do choque térmico, são identificadas como os principais imunógenos em várias doenças infecciosas (ARORA et al., 2008), sendo a família da HSP70 comum em soro de pacientes com LV (WALLACE et al., 1992; ARORA et al., 2000). Após mapeamento de HSP70 cDNA (ARORA; MELBY; SEHGAL, 1995; ARORA et al., 2000), abordagens com PCR foram feitas utilizando os iniciadores *Hsp70sen* e *Hsp70ant* (GARCIA et al., 2004). Um produto de 1.300 pb foi amplificado com estes parasitos, o mesmo encontrado com o DNA de *T. cruzi*, mas nenhum produto foi observado com *M. tuberculosis* ou *Sporothrix schenckii*. Dessa forma, falsos positivos podem ser obtidos em pacientes chagásicos.

Arora et al. (2008), desenvolveram uma PCR utilizando os iniciadores desenhados LDS e LDK, amplificando um fragmento de 243 pb do genoma de *L. donovani*. O ensaio

obteve uma sensibilidade de 0,5 pg de DNA, aumentando-se para 0,05 pg ao se utilizar uma sonda interna (583-609 bp) no Southern blot. Os autores não observaram amplificações com DNA das espécies *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. aethiopica*, *Entamoeba histolytica*, *M. tuberculosis* e *P. vivax*. Por ser específico para *L. donovani*, o uso dessa PCR pode não ser adequado onde outras espécies são os agentes responsáveis pela LV.

A gp63 é a principal glicoproteína presente na membrana celular de *Leishmania sp*, desempenhando papel fundamental na virulência do parasito e na estimulação da mesma quanto à resposta celular e humoral do hospedeiro (HOYA et al., 1999). Devido ao polimorfismo dessas regiões gênicas, os produtos de amplificação podem ser distintos entre *L. infantum* e *L. donovani*, podendo-se aplicar a identificação de espécies e/ou linhagens pela restrição dos fragmentos (ELAMIN et al., 2008). Os iniciadores SG1/SG2, PDD1/PDD2, TV255 /TV256 foram desenhados para amplificar regiões codificantes dos genes gp63 (GUERBOUJ et al., 2001; TUPPERWAR et al., 2008). Em relação a parasitos humanos, esses iniciadores parecem específicos para o gênero *Leishmania* pela análise pelo primer-BLAST.

Outro alvo estudado recentemente é a região gênica que codifica o antígeno K26, uma proteína hidrofílica de superfície. O par de iniciadores K26f/K26r mostrou-se específico para o complexo *L. donovani*, com produtos que variam de 284-1.300 pb, discriminando entre *L. infantum* e *L. donovani* (HARALAMBOUS et al., 2008).

Com o par Fme/Rme (MARFURT et al., 2003a), o produto formado é aproximadamente 400 pb para *L. donovani*, porém há amplificação de 400-430 pb para outros cinetoplastídeos, como *Crithidia bombi*, *Crithidia lucilia* e *Crithidia fasciculata*, mas nada foi observado para *T. b. rhodesiense*, *T. b. gambiense* e *T. cruzi*.

Fisa et al. (2008b), desenvolveram uma Nested-PCR que tem como iniciadores externos o par Ext/E2b e para segunda reação os iniciadores P-I/P-2 (PIARROUX et al., 1993), produzindo fragmento de 100 pb. A Nested-PCR detectou DNA de *Leishmania* em 18% dos pacientes infectados por HIV, cujas culturas foram negativas. Além disso, essa PCR detectou DNA de *Leishmania* nas amostras biológicas 5 a 6 meses antes de a cultura ser positiva. Quando testada com células mononucleares e com o *buffy coat* do sangue para transplante, o método molecular foi capaz de identificar um alto número de doadores assintomáticos (SERIN et al., 2005), podendo o sangue ser fonte de infecção para os receptores. Esse sistema pode ser utilizado para monitoramento do tratamento, utilizando como amostras biológicas o sangue ou a urina do paciente (RIERA et al., 2004; FISA et al., 2008a). A análise pelo BLAST demonstrou a especificidade dessa Nested-PCR para *L. infantum*. Na prática, isso pode dificultar seu uso para diagnóstico de LV por outras espécies do complexo *L. donovani*. Vale ressaltar o pequeno tamanho da banda produzida (100 pb), o que leva a dificuldade de interpretação de resultados.

Os genes nucleares do mini-exon estão presentes nas células do gênero *Leishmania* e

em outros cinetoplastídeos, mas ausente nos mamíferos e vetores. Estão presentes nessas células em número de cópias de 100-200 tandem, separados por genes transcritos e não transcritos. A região transcrita é composta pelo exon altamente conservado com 39 nucleotídeos, e o intron, moderadamente conservado, variando no tamanho entre as espécies do mesmo gênero ou subgênero (FERNANDES et al., 1994; MARFURT et al., 2003b). Utilizando os iniciadores S-1629 e S-1630 para as espécies do complexo *L. donovani*, todas apresentam um produto de aproximadamente 450 pb (KATAKURA et al., 1999). Bons resultados para diferenciação das espécies em amostras clínicas foram alcançados nas pesquisas onde o alvo da RFLP-PCR era a região dos mini-exons (MARFURT et al., 2003a, 2003b; SERIN et al., 2005). Ao realizar a análise de homologia pela ferramenta primer-BLAST, verificou-se que esses iniciadores amplificam DNA de uma ampla gama de organismo, inclusive *Homo sapiens*. Porém, não foi notificado o seu reconhecimento por DNA de *Leishmania* sp.

CONCLUSÃO

As abordagens moleculares baseadas em PCR são ferramentas sensíveis e específicas para o diagnóstico da leishmaniose visceral em humanos. Destacamos o poder da PCR em discriminar as espécies de *Leishmania*, o que não é possível pela visualização microscópica do parasito, pesquisa de antígeno ou pela sorologia. Devido à ampla variedade de alvos e iniciadores disponíveis, ainda não há um procedimento "padrão ouro", o que dificulta a

inserção desse ensaio na rotina dos serviços de saúde. Nosso trabalho aponta quais as vantagens e desvantagens dos principais alvos moleculares e iniciadores, oferecendo informações para que o profissional possa escolher o sistema de PCR mais adequado à necessidade do seu serviço.

REFERÊNCIAS

- ALAM MZ et al. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. *Tropical Medicine International Health*, 2009,14(5): 499-503.
- AMRO A et al. Epidemiology of paediatric visceral leishmaniasis in Hebron district, Palestine. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*, 2009, 103: 731-736.
- ANDERS G et al. Distinguishing *Leishmania tropica* and *Leishmania major* in the Middle East using the polymerase chain reaction with kinetoplast DNA specific primers. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*, 2002, 96(suppl. 1): 87-92.
- ANDRESEN K et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by the polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymph node samples from patients from the Sudan. *Tropical Medicine International Health*, 1997, 2(5): 440-444.
- ANTINORI S et al. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 2007, 44: 1602-1610.
- ARORA SK, MELBY PC, SEHGAL S. Lack of serological specificity of recombinant heat shock protein 70 of *Leishmania donovani*. *Immunology and Cell Biology*, 1995, (73): 446-451.
- ARORA SK et al. Identification of sero-specific epitope of recombinant heat shock protein (HSP70) of *Leishmania donovani*. *Journal of Parasitic Disease*, 2000, 24: 21-26.
- _____. An epitope-specific PCR test for diagnosis of *Leishmania donovani* infections. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*, 2008, 102: 41-45.
- ASSIS TSM et al. Detection of *Leishmania* kDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*, 2009, 103: 1269-1272.
- ATTAR ZJ et al. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Tropical*, 2001, 78: (1): 11-16.
- BADER KA et al. Short communication: Palestinian infantile visceral leishmaniasis caused by a genetic variant of *Leishmania infantum* belonging to a new zymodeme. *Tropical Medicine and International Health*, 2005, 10(6): 618-620.
- BECKMAN JS, WEBER JL. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, 1992, 12(4): 627-631.
- BHATTARAI NR et al. PCR and direct agglutination as *Leishmania* infection markers among healthy Nepalese subjects living in areas endemic for Kala-Azar. *Tropical Medicine and International Health*, 2009, 14(4): 404-411.
- _____. Development and evaluation of different PCR-based typing methods for discrimination of *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Parasitology*, 2010, 29: 1-11.

BOTILDE Y et al. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infection, Genetics and Evolution*, 2006, 6: 440-446.

BRENIÈRE, S. F. et al. Polymerase chain reaction-based identification of New World *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes. *Acta Tropical*, 1999, 73: 283-293.

BRUSTOLONI YM et al. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2007, 102(4): 497-500.

BULLE B et al. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(9): 3391-3397.

CORTES S et al. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*, 2004, 98: 12-17.

_____. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitology International*, 2006, 55: 277-283.

CORTES SJC. Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal. 2008. 163 p. Tese (Doutorado)–Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

CRUZ I et al. Spanish HIV-*Leishmania* study group. Nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with Human Immunodeficiency Virus. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*, 2002, 96(suppl. 1): 1185-1189.

_____. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(7): 2343-2347.

DEBORGGRAEVE S et al. Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical visceral leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease. *Tropical Medicine and International Health*, 2008, 13(11) 1378-1383.

DENIAU M et al. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2003, 97(1): 15-33.

DISCH J et al. Single-step duplex kDNA-PCR for detection of *Leishmania donovani* complex in human peripheral blood samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2006, 56: 395-400.

DONCKER S et al. A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*, 2005, 99: 25-31.

DOURADO ZFS et al. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rk39). *Revista de Patologia Tropical*, Goiânia, 2007, 36(3) 205-214.

EL TAIL N et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*, 2000, 94: 575-579.

ELAMIN EM et al. Identification of *Leishmania donovani* as a cause of cutaneous leishmaniasis in Sudan. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*, 2008, 102: 54-57.

FAKHAR M et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2008, 102(7) 1-7.

FERNANDES O et al. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1994, 66: 261-271.

FERREIRA ME, GRATTAPAGLIA D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: Embrapa, 1998.

FISA R et al. *Leishmania infantum* DNA detection in urine from patients with visceral leishmaniasis and after treatment control. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2008a, 78(5): 741-744.

_____. A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*, 2008b, 96(suppl. 1): 191-194.

FISSORE C et al. Convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(11) 5332-5333.

FLOETER-WINTER, LM. Descrição e utilização de alvos moleculares para identificação de *Leishmania* por PCR. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa73_leishmania.htm>. Acesso em: 3 maio 2010.

GARCIA L et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(5): 2294-2297.

GARCÍA-GARCÍA JA et al. Use of noninvasive markers to detect *Leishmania* infection in asymptomatic human immunodeficiency virus infected patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44: 4455-4458.

GAVGANI AM, KHADEM VATAN S, GHAZANCHAEI A. KAtex antigen-detection test as a diagnostic tool for latent visceral leishmaniasis cases. *African Journal of Biotechnology*, 2008, 7(7): 852-859.

GERAMIZADEH B, FAKHAR M, MOTAZEDIAN MH. Visceral leishmaniasis with duodenal involvement: three immunocompetent cases from southern Iran. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2006, 100: 637-640.

GONTIJO CMF, MELO MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 2004, 7(3): 338-349.

GUERBOUJ S et al. Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure?, 2001, 122: 25-35.

HARALAMBOUS C et al. Development of a molecular assay specific for the *Leishmania donovani* complex that discriminates *L. donovani*/*Leishmania infantum* zymodemes: a useful tool for typing MON-1. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2008, 60: 33-42.

HOYA, RD et al. *Leishmania panamensis*: a 44bp deletion in gp63 gene is found in cDNA and genomic libraries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1999, 94(5): 641-643.

JUNIOR MSCL et al. 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) 303-308.

KALLEL K et al. Asymptomatic bearing of *Leishmania infantum* among Tunisian HIV infected patients. *Pathologie Biologie*, 2007, 55: 521-524.

KATAKURA K et al. *Leishmania* mini-exon genes for molecular epidemiology of leishmaniasis in China and Ecuador. *The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 1999, 26(3): 393-399.

KAZEMI-RAD E et al. Diagnosis and characterization of *Leishmania* species in giemsa-stained slides by PCR-RFLP. *Iranian Journal of Public Health*, 2008, 37(1): 54-60.

KONGKAEW W et al. Autochthonous visceral leishmaniasis: a report of a second case in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 2007, 38(1) 8-12.

KUHLS K et al. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes and Infection*, 2007, 9: 334-343.

KYRIAKOU DS et al. Quick detection of *Leishmania* in peripheral blood flow cytometry. Is prestorage leucodepletion necessary for leishmaniasis prevention in endemic areas? *Transfusion Medicine*, 2003, 13: 59-62.

LACHAUD L et al. Optimized PCR Using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(1): 236-240.

_____. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(2): 613-617.

LAMBSON B, SMYTH A, BARKER D. Sequence homology within a minicircle class of the *Leishmania donovani* complex. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1999, 101: 229-232.

_____. *Leishmania donovani*: Development and characterisation of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. *Experimental Parasitology*, 2000, 94: 15-22.

LE FICHOUX Y et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in Southern France. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(6): 1953-1957.

MAIA-ELKHOURY ANS et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2008, 24(12) 2941-2947.

MARFURT J et al. Identification and Differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the mini-exon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003a, 41(7) 3147-3153.

_____. Diagnostic genotyping of old and new World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2003b, 46: 115-124.

MARTIN-SANCHEZ J et al. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. *Parasitology*, 2001, 122: 607-615.

MARY C et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(11): 5249-5255.

_____. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2006, 75(5): 858-863.

- MATEUS RP et al. Caracterização preliminar do espaçador interno transcrito-1 its-1 do DNA ribossômico nas espécies do *Cluster buzzatii* de *Drosophila* (Diptera: drosophilidae). *Ambiência*, Guarapuava, 2006, 2(1): 89-96.
- MAURYA R et al. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(7): 3038-3041.
- MONROY-OSTRIA A, HERNANDEZ-MONTES O, BARKER DC. Aetiology of visceral leishmaniasis in México. *Acta Tropical*. 2000, 75: 155-161.
- MORALES MA et al. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*, 2001, 95: 104-107.
- _____. Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of Infectious Diseases*, 2002, 185: 1533-1537.
- 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, 60: 151-154.
- OCHSENREITHER, S. et al. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(2) 495-503.
- PIARROUX R et al. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1993, 49(3): 364-369.
- PIZZUTO M et al. Role of PCR in Diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39: 357-361.
- RIERA C et al. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*, 2004, 98: 102-110.
- RODRIGUEZ NM et al. Genetic homogeneity within *Leishmania (L.) infantum* isolated from human and dogs: the relationship with the sandfly fauna distribution in endemic areas of Nueva Esparta State, Venezuela. *Parasitology*, 2005, 130: 611-619.
- ROLÃO N et al. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction – enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Parasitology*, 2004, 90(5) 1150-1154.
- ROSSI V et al. Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1994, 65(2) 271-282.
- SALAM MA et al. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of kala-azar in an endemic zone of Bangladesh. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 2009, 25: 4635-4640.
- SALOTRA P et al. Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(3): 849-854.
- SCHÖNIAN G et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2003, 47: 349-358 .

SERIDI N et al. Application of PCR-RFLP for the exploration of the molecular diversity of *Leishmania infantum* in Algeria. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*, 2008, 102: 556-563.

SERIN MS et al. Rapid diagnosis and genotyping of *Leishmania* isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of mini-exon region. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2005, 53: 209-214.

SHARMA P et al. Comparative in vivo expression of amastigote up regulated *Leishmania* genes in three different forms of leishmaniasis. *Parasitology International*, 2010, 59(2): 262-264.

SMYTH AJ et al. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, 1992, 105: 183-192.

SREENIVAS G et al. Nested PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in slit aspirates from post-kala-azar dermal leishmaniasis lesions. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(4): 1777-1778.

STARK D et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a human immunodeficiency virus type 1-infected patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(3): 1178-1180.

SUKMEE T et al. A suspected new species of *Leishmania*, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. *International Journal of Parasitology*, 2008, 38: 617-622.

SUNDAR S, RAI M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2002, 9: 951-958.

TELLERIA J et al. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Experimental Parasitology*, 2006, 114(4): 279-288.

TUPPERWAR AN et al. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2008, 61: 23-30.

ULIANA SR et al. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. *Experimental Parasitology*, 1991, 72: 157-163.

VAN EYS GJJM et al. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1992, 51: 133-142.

VILLINSKIA JT et al. Evidence for a new species of *Leishmania* associated with a focal disease outbreak in Ghana. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2008, 60: 323-327.

WALLACE GR et al. Mapping of a visceral leishmaniasis-specific immunodominant B-cell epitope of *Leishmania donovani* Hsp70. *Infection and Immunity*, 1992, 60: 2688-2693.