

## EMPREGO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM HUMANOS. I – OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO\*.

Edgar S. Pereira<sup>(1)</sup>; Sérgio Luz<sup>(2)</sup>; Francimeire G. Pinheiro<sup>(3)</sup>; José F. Franco<sup>(3)</sup> Luanda P. Figueira<sup>(3)</sup> & Antonia Maria R. Franco<sup>(4)</sup>.

<sup>(1)</sup>Bolsista CNPq/PIBIC. <sup>(2)</sup>Co-orientador FIOCRUZ/CPQLMD. <sup>(3)</sup>Colaboradores INPA/CPCS. <sup>(4)</sup>Orientador INPA/CPCS.

As leishmanioses são doenças causadas por flagelados do gênero *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida: Trypanosomatidae), consideradas como sendo a segunda doença causada por protozoários de importância em Saúde Pública, superada apenas pela malária (WHO, 2000). Exames parasitológicos atualmente utilizados para o diagnóstico de leishmaniose do Novo Mundo são analisados principalmente por biópsias das lesões processadas para o exame histopatológico, preparo de lâminas coradas de impressões de tecidos e cultura axênica. Contudo, uma baixa parasitemia em amostras clínicas e/ou o crescimento deficiente “in vitro” podem dificultar o uso das técnicas parasitológicas. A amplificação de DNA através da PCR tem várias vantagens comparadas às técnicas tradicionais, tal como inato ao homem à detecção de agentes infecciosos presentes em número muito reduzido e a possibilidade de realizar ensaios com diversas amostras clínicas (Pirmez *et al.*, 1999). O presente trabalho tem como objetivo avaliar a reação da Ln-PCR (Nested-PCR) comparando com as técnicas tradicionais para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar em pacientes examinados no Estado do Amazonas. Foram coletadas amostras de biópsias nas bordas das lesões de 14 pacientes provenientes de área endêmica e suspeitos de LTA, encaminhados a este laboratório, onde o aspecto das lesões cutâneas e/ou mucocutâneas foram caracterizadas de acordo com o tipo clínico da doença. O diagnóstico da enfermidade foi realizado mediante a seguinte análise: história epidemiológica compatível, presença de lesões típicas, detecção direta do parasito, cultivo e inoculação em animais de laboratório. As biópsias coletadas foram adicionadas diretamente no conservante álcool etílico P.A absoluto, em seguida, foram realizadas extrações de DNA de acordo com protocolo modificado do método de Coen *et al.* (1982). Após a extração do DNA individual de cada amostra, estes eram adicionadas as reações da PCR, amplificando-se as regiões de mini-exon de flagelados do gênero *Leishmania*. A reação foi feita em duas etapas, com o objetivo de aumentar a sensibilidade, utilizando-se dois iniciadores em cada uma das reações [etapa 1: SL1 5'-CAG AAA CTG ATA CTT ATA TAG-3' e SL2 5'-GTA TCA GTT TCT GTA CTT TAT TG-3'/ e etapa 2:

SLM1 5'-GGT ATG CGA AAC TTC CGG-3' e SLM2 5'-CTG ATA CTT ATA TAG CGT TAG-3']. A reação foi realizada em 35 ciclos de amplificação, sob as seguintes condições: desnaturação, a 85° C por 4 min, 94° C por 7 min, 94° C por 20 seg., anelamento, a 50° C por 30 seg e extensão a 72° C por 20 seg. (etapa final de 10 min.), terminando a 4° C. Os amplicóns obtidos referem-se aos sub-gêneros *Leishmania* e *Viannia*, para os tamanhos de: 451 pb para *L.infantum*/*L. chagasi*; 302 pb para *L. amazonensis* (sub-gênero *Leishmania*); e 242 pb para *L. braziliensis* (sub-gênero *Viannia*). Ensaio utilizando-se a reação de "Ln-PCR" foram realizados em amostras de DNA extraídos de: parasitos representantes de diversas espécies de leishmânias consideradas como cepas de referência da OMS (controles positivos); biópsia de indivíduo não infectado foi utilizada como controle negativo; amostras de flagelados isolados de hamsters (*Mesocricetus auratus*); e em cultivo da biópsias de lesões testadas pela PCR. Os resultados obtidos foram de acordo com a presença de fragmentos amplificados de tamanhos que correspondem ao esperado nos géis de agarose, sendo também verificada positividade em amostras de hamsters infectados e cultivos de flagelados das lesões com fragmentos de 242pb. De acordo com a apresentação clínica, a forma predominante foi a cutânea localizada, caracterizando lesões dérmicas ulceradas, papulosas e crateriformes, únicas e/ou ocasionalmente múltiplas. As amostras de biópsias foram testadas pela Ln-PCR verificando-se a presença de fragmentos de 242pb referente ao sub-gênero *Viannia* em 12 pacientes (85%); pela detecção direta foram visualizadas amastigotas de *Leishmania* em 10 (71%); pelo cultivo foram visualizadas promastigotas dos flagelados em 7 (50%) amostras de cultura; e pela inoculação em hamsters observou-se lesões típicas em 3 animais (21%). Este resultado preliminar demonstra que a PCR aparenta ser a ferramenta ideal para o diagnóstico de leishmaniose em rotina de laboratório, apesar do alto custo, proporcionando importantes informações epidemiológicas sobre a doença em locais onde ela é endêmica, principalmente, no Estado do Amazonas.

Pirmez, C.; Silva Trajano, V.; Paes Oliveira, M.; Cruz, A.; Costa, S.; Catanho, M.; Degrave, W.; Fernandes, O., 1999. Use of PCR in diagnosis of human American Tegumentary Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin Microbiol.* 37: 1819-1823.

World Health Organization (WHO) 2000. Control of the Leishmaniases, Technical Report Series N° 793. World Health Organization, Genebra, 158p.

Coen, E. S.; Thoday, J. M.; Dover, G. Rate of turnover of variants in the r DNA gene family of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 295: 564-568, 1982.

\*Aprovado pelo Comitê de Ética da FIOCRUZ/RJ (N° REGISTRO/PROTOCOLO: 210/03; DATA DE PUBLICAÇÃO: Aprovado em 21 de julho de 2003/Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) e ao CONEP/MS)