

Leila Martins

Aline Alexandrino

Georgia Guimarães

# Detecção de DNA de *Leishmania braziliensis* em pacientes de Leishmaniose Tegumentar Americana

## Detection of *Leishmania braziliensis* DNA in American Tegumentary Leishmaniasis patients

---

### RESUMO

Foi realizado diagnóstico para leishmaniose tegumentar americana a partir de sangue de pacientes residentes em dois municípios endêmicos do estado de Pernambuco. O DNA de 119 amostras de sangue foi extraído e submetido a reação em cadeia da polimerase. Utilizaram-se primers do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania braziliensis*, circulante em Pernambuco, cuja seqüência-alvo gera um fragmento de 750 pares de bases. No total 58 (48,7%) indivíduos apresentaram amplificação positiva e 61 (51,3%) negativa. Das amostras positivas para a PCR, 37 ( $\cong$  64%) pertenciam a indivíduos tratados e sem lesão. Conclui-se que a técnica de PCR é eficaz para identificar o DNA de leishmania em material de biópsias e em sangue venoso.

**DESCRIPTORIOS:** Leishmaniose Cutânea, diagnóstico. *Leishmania braziliensis*, isolamento & purificação. Reação em Cadeia da Polimerase, utilização. Técnicas de Diagnóstico Molecular. Sensibilidade e Especificidade.

---

### ABSTRACT

Diagnostic tests for American tegumentary leishmaniasis were performed on blood samples of patients living in two endemic municipalities in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. DNA was extracted from 119 samples and used as template for polymerase chain reaction (PCR) analysis. The tests used primers specific for the kinetoplast mini-circle DNA (kDNA) of *Leishmania braziliensis*, a species circulating in Pernambuco, which amplify a 750 base pair target sequence. In total, 58 subjects (48.7%) showed positive PCR amplification and 61 (51.3%) were negative. Of the PCR-positive samples, 37 ( $\cong$ 64%) were from treated, lesion-free subjects. In conclusion, the PCR technique is efficacious at identifying leishmania DNA in biopsy and venous blood samples.

**DESCRIPTORS:** Leishmaniasis, Cutaneous, diagnosis. *Leishmania braziliensis*, isolation & purification. Polymerase Chain Reaction, utilization. Molecular Diagnostic Techniques. Sensitivity and Specificity.

Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular. Departamento de Genética. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE, Brasil

#### Correspondência | Correspondence:

Leila Martins  
Diretoria de Ensino  
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)  
Rua dos Coelhos, 300 Boa Vista  
50.070-550 Recife, PE, Brasil  
E-mail: leilamartins2003@yahoo.com.br

Recebido: 15/5/2009  
Aprovado: 7/11/2009

Artigo disponível em português | inglês em  
[www.scielo.br/rsp](http://www.scielo.br/rsp)

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma zoonose endêmica nos trópicos e neotrópicos que aumenta em cerca de 1,5 milhão de casos a cada ano, mundialmente.<sup>4</sup> Caracteriza-se por diversas manifestações clínicas, que abrangem desde pequenos nódulos à destruição da mucosa.<sup>4</sup> No Brasil, pode ser encontrada em todas as macrorregiões, com alta incidência anual.<sup>a</sup> No Nordeste o número de casos registrados é significativo, constituindo 30,5% dos casos do País.<sup>a</sup> O estado de Pernambuco apresentou um coeficiente de detecção de casos de 9,6 em 1990 e 4,2 em 2008.<sup>a</sup>

Apesar de várias espécies de *Leishmania* estarem envolvidas na manutenção da LTA no País, a *Leishmania braziliensis* é a espécie predominante como agente etiológico. Estudos prévios em áreas endêmicas de Pernambuco mostraram que os parasitas isolados de pacientes e roedores com essa patologia pertencem a essa espécie.<sup>5</sup>

Como a LTA é um problema endêmico de saúde no Nordeste do Brasil, há necessidade de um diagnóstico rápido e preciso, que identifique os indivíduos infectados e revele se existe material do parasita em indivíduos considerados curados, para prevenir recidivas, a manutenção e até a expansão da endemia. Uma das técnicas que possui efetividade e sensibilidade em relação às outras técnicas utilizadas para diagnóstico é a *polimerase chain reaction* (PCR).<sup>3</sup>

Dada a importância do diagnóstico acurado, o objetivo do presente estudo foi verificar a disseminação hematogênica da leishmania e sua detecção em sangue periférico, incluindo os pacientes considerados clinicamente curados.

## MÉTODOS

Foram escolhidos dois municípios endêmicos do estado de Pernambuco: o Cabo de Santo Agostinho, que por ocasião da coleta (2004) estava passando por um surto de LTA, e o município de Triunfo, que apresentou um surto no ano de 2001. Os pacientes foram selecionados a partir das unidades básicas de saúde de cada município. Foram coletadas 63 amostras de sangue venoso de indivíduos do Cabo e 56 de Triunfo. O sangue venoso foi escolhido devido à possibilidade de disseminação hematogênica<sup>6</sup> e por constituir uma coleta mais confortável para o paciente. Amostras de sangue venoso de indivíduos não-infectados, moradores de área não-endêmica de LTA e sem histórico de LTA, como também sangue sem DNA do parasita, foram utilizados como controle negativo na investigação.

O DNA foi extraído com o kit (DNAzol BD Reagent®, Life Technologies) específico para material sanguíneo, de acordo com o protocolo do fabricante. Ao final da extração obteve-se 20-40 µg de DNA por mL de sangue total. O DNA foi estocado em freezer a -20°C.

As reações foram preparadas a partir do kit (Ready-to-go PCR Beads®, Amersham Biosciences) cujos componentes são liofilizados. Acrescentou-se ao kit 7 µL do DNA, 16 µL de água e 1 µL de cada *primer* (20 pmoles), resultando num volume final de 25 µL. Foram utilizados os primers B1 e B2,<sup>1</sup> que amplificam uma sequência de 750 pares de bases do kDNA da leishmania e cujas sequências são:

B1: 5'- GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG - 3'

B2: 5'- CTA ATT GTG CAC GGG GAG G - 3'

Todas as reações incluíram controle positivo (*L. braziliensis* – MHOM/BR/1975/M2903) e negativo (DNA de indivíduo não-infectado; sem DNA). Utilizou-se um termociclador (Biometra®) com o seguinte programa:<sup>1</sup>

1ª. Etapa: 96°C por 6 min; 2ª. Etapa: 93°C por 30 seg; 3ª. Etapa: 60,8°C por 1 min; 4ª. Etapa: 72°C por 1 min; 5ª. Etapa: volta para etapa 2, 39x; 6ª. Etapa: 72°C por 10 min; 7ª. Etapa: 4°C por ∞.

O produto da amplificação foi analisado em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado por um capturador de imagens e digitalizado em arquivo eletrônico.

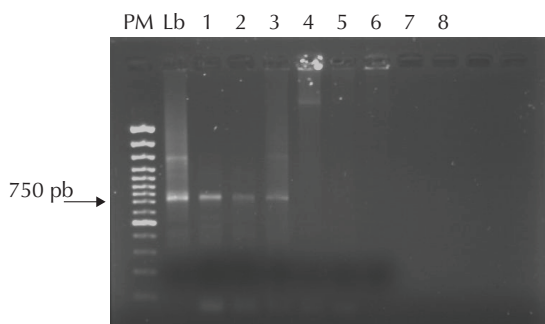
Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco (Protocolo 233/2002-CEP/CCS).

## RESULTADOS

Todos os pacientes foram diagnosticados por um médico e variaram quanto ao tratamento. Cabo: oito pacientes não tinham sido tratados, 14 estavam em tratamento no momento da coleta, 41 tinham sido tratados, dos quais 40 foram considerados clinicamente curados. Triunfo: 54 tinham completado o tratamento há pelo menos dois anos antes da coleta, um tinha interrompido o tratamento e um havia abandonado o tratamento por ter apresentado cura espontânea.

No total, 95 pacientes, sendo 40 do Cabo e 55 de Triunfo, apresentaram o critério de cura, que é a reepitelização da lesão.

<sup>a</sup> Ministério da Saúde. Coeficiente de detecção de casos de leishmaniose tegumentar americana por 100.000 habitantes: Brasil, grandes regiões e unidades federadas: 1990 a 2008 [internet]. 2009 [citado 2009 set 14]. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/coef\\_deteccao\\_lta\\_2008](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/coef_deteccao_lta_2008)



**Figura.** Pacientes PCR-positivo e PCR-negativo. PM= peso molecular 100 pb; Lb= *L. braziliensis* (controle+); poços 1-3=pacientes PCR-positivo; poços 4-6= pacientes PCR-negativo; poço 7=controle- (indivíduo não-infectado); poço 8=controle- (sem DNA).

Nas amostras do Cabo a maioria dos indivíduos (49/63, 77,7%) teve resultado PCR-positivo. Destes, 28 (57,0%) apresentavam o critério de cura. No caso de Triunfo, nove indivíduos da amostra (16,0%) apresentavam o critério de cura e foram PCR-positivos.

No total 58 (48,7%) indivíduos foram PCR-positivos e os demais 61 (51,3%), negativos. Das amostras positivas para a PCR, 37 ( $\cong$  64%) pertenciam a indivíduos tratados e sem lesão.

Três pacientes PCR-positivos e três pacientes PCR-negativos estão representados na Figura, assim como os controles positivo e negativo, para as amostras das áreas investigadas.

## DISCUSSÃO

Como há relatos de disseminação hematogênica da leishmania, assim como sua detecção em sangue periférico,<sup>6</sup> o presente trabalho mostrou que é possível utilizar sangue venoso para diagnosticar LTA, uma vez que isso poderia ser realizado a partir de qualquer coleta para hemograma, utilizando quantidades mínimas, como 0,5 a 1 mL.

A técnica de PCR foi escolhida em função de alguns critérios. O primeiro referia-se ao fato de que os pacientes relatavam desconforto por ocasião da coleta da biópsia da lesão. O segundo motivo foi a otimização das chances de se encontrar o DNA do parasito no

sangue de um indivíduo que tivesse sido infectado, pela utilização do *primer* do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) da leishmania, o qual apresenta de 10.000 a 50.000 moléculas por célula. O terceiro motivo devia-se à rapidez do diagnóstico, que não depende da inoculação em cobaias, ou da cultura de parasitas, técnicas que demandam tempo e nem sempre fornecem garantia de que haverá resultados, ou de que não ocorrerá contaminação, respectivamente. Um teste de PCR pode ser realizado em poucas horas e em número considerável de amostras.

Finalmente, estudos realizados em biópsias mostraram que a PCR foi capaz de detectar DNA de leishmania em amostras em que os resultados de técnicas como *imprint* e histopatológico haviam sido negativos.<sup>2</sup> A PCR de biópsias também mostrou a presença de DNA de *L. braziliensis* em indivíduos considerados clinicamente curados há mais de dez anos.

Apesar da cura clínica da lesão, a PCR pode permanecer positiva por muitos anos depois. Tudo isso indica o uso da PCR como uma ferramenta que poderia verificar e analisar a presença de material do parasita. Esse fato é confirmado pelo achado em que, dos 93 pacientes sem lesão, 37 (39,8%) foram PCR-positivos, o que indica a presença do material da leishmania. Destes, 28 eram do Cabo e nove de Triunfo; todos tinham sido tratados e os de Triunfo haviam sido considerados curados há pelo menos dois anos.

Mendonça et al<sup>2</sup> prepararam culturas a partir de 32 biópsias de lesão e identificaram DNA de *L. braziliensis*, utilizando a PCR em três pacientes considerados curados há seis anos. Esses autores<sup>2</sup> consideram que a presença do DNA pode ocorrer em razão da estratégia de sobrevivência microbiana, que decorre de mecanismos, como modulação de atividade antimicrobiana da célula hospedeira, síntese ou inibição de citocinas, deteriorização na ativação das células T e recuo dos patógenos para dentro de células que não executam a resposta imune. Outra explicação pode ser a maior chance de exposição ao parasita e, portanto, uma reinfecção dos indivíduos considerados clinicamente curados, em regiões endêmicas.

Concluindo, a técnica de PCR mostrou ser capaz de identificar DNA de leishmania, não apenas em material de biópsias como também em sangue venoso.

## REFERÊNCIAS

1. De Bruijn MH, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop*. 1992;52(1):45-58. DOI:10.1016/0001-706X(92)90006-J
2. Mendonça MG, de Brito ME, Rodriguez EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of american cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis*. 2004;189(6):1018-23. DOI:10.1086/382135
3. Mihoubi I, de Monbrison F, Romeuf N, Moulahem T, Picot S. Outsourced real-time PCR diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the outbreak region of Constantine, Algeria. *Med Trop (Mars)*. 2006;66(1):39-44.
4. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(9):581-96. DOI:10.1016/S1473-3099(07)70209-8
5. Rodrigues EH, Felinto de Brito ME, Mendonça MG, Werkhäuser RP, Coutinho EM, Souza WV, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in a area of endemicity in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol*. 2002;40(10):3572-6. DOI:10.1128/JCM.40.10.3572-3576.2002
6. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(3):239-51. DOI:10.1590/S0074-02762004000300001

---

Artigo baseado na dissertação de mestrado de Martins L, apresentada à Universidade Federal de Pernambuco em 2005. Os autores declaram não haver conflito de interesses.