

**FACULDADE PATOS DE MINAS
CURSO DE BIOMEDICINA**

LEILA DE FATIMA DA CRUZ

**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) NO
DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES**

**PATOS DE MINAS
2016**

LEILA DE FATIMA DA CRUZ

**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) NO
DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES**

Artigo apresentado à Faculdade Patos de Minas como requisito parcial para a conclusão do Curso de Biomedicina

Orientador: Prof.^a Esp. Ms. Taciano dos reis Cardoso

**PATOS DE MINAS
2016**

LEILA DE FATIMA DA CRUZ

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) NO DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado em 03 de Novembro de 2016, pela comissão examinadora constituída pelos professores:

Orientador: _____
Prof.^o. Ms. Taciano dos Reis Cardoso
Faculdade Patos de Minas

Examinador: _____
Prof.^a. Dra Sandra Regina Afonso Cardoso
Faculdade Patos de Minas

Examinador: _____
Prof.^o. Me. Paulo Vinícius Rocha Pereira
Faculdade Patos de Minas

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) NO DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES

Leila de Fatima da Cruz*

Prof.º Ms. Taciano dos Reis Cardoso**

RESUMO

As Leishmanioses Visceral e Tegumentar são zoonoses que causam grande impacto na população mundial e brasileira, sendo assim o presente artigo foi desenvolvido a partir de estudos exploratórios por meio de pesquisa bibliográfica visando o alcance do diagnóstico precoce nas infecções causadas por leishmanias. No Brasil, os testes mais empregados são os testes sorológicos: reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), exame direto (Punção de fígado, baço e raspado de pele), cultura e Reação de Montenegro. A técnica de Reação em Cadeia Polimerase (PCR) apresenta uma expectativa positiva para o diagnóstico das leishmanioses com alta positividade e especificidade. É necessário que os profissionais de saúde, tais como os médicos de diagnóstico humano e animal conheçam os métodos diagnósticos laboratoriais mais eficazes e também as políticas públicas de saúde e de saneamento aprimorem e ampliam os recursos, disponibilizando esses métodos para o alcance do diagnóstico e intervenção terapêutica precoce causada por esta doença infecciosa.

Palavras-chave: Leishmanioses. Diagnóstico. Sensibilidade. Especificidade.

ABSTRACT

Visceral and integumentary leishmaniasis are zoonoses that cause a great impact on the world and Brazilian population, and this article was developed from exploratory studies through a bibliographical research aimed at reaching the early diagnosis in leishmaniasis infections. In Brazil, the most commonly used tests are serological tests: Indirect Immunofluorescence (IFAT) and Enzyme Immunoabsorption Assay (ELISA), direct examination (Liver puncture, spleen and skin scraping), Culture and Montenegro Reaction. The Polymerase Chain Reaction (PCR) technique presents a positive expectation for the diagnosis of leishmaniasis with high positivity and specificity. Health professionals such as human and animal diagnostic physicians need to be aware of the most effective laboratory diagnostic methods, as well as public health and sanitation policies, to improve and expand resources by making these methods available for the achievement of diagnosis and intervention Therapy caused by this infectious disease.

Key words: Leishmaniasis. Diagnosis. Sensitivity. Specificity.

*Aluna do Curso de Biomedicina da Faculdade de Patos de Minas (FPM) formando no ano de 2016. leilafatimacruz@hotmail.com

**Orientador, professor no curso de Biomedicina da Faculdade Patos de Minas, Mestre em Odontologia Área Biopatologia. (FPM). tacionoreis@hotmail.com

INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são consideradas como zoonoses ocasionadas por protozoários do gênero *Leishmania spp.* São definidas clinicamente como leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT). Apresentam elevada prevalência em regiões tropicais como o Brasil.^(1,9)

As Leishmanioses apresentam distribuição diferente no interior do tubo digestivo dos vetores e assumem forma flagelada indistinguível entre as espécies. O isolamento do agente proveniente de insetos em meios de cultura se torna difícil, uma vez que as fêmeas de flebotomíneos também são hospedeiras de espécies de *Trypanosoma* e *Endotrypanum* por um estágio de promastigotas. A identificação e caracterização de leishmanias são proeminentes nos estudos epidemiológicos, na análise da doença e na avaliação terapêutica.^(1,8)

As técnicas analíticas parasitológicas ultimamente empregadas oferecem baixa sensibilidade e desvantagens operacionais nas regiões endêmicas, a infra-estrutura ainda é bem deficiente nessas áreas. Por este ensejo, a busca de testes mais eficazes empregando métodos moleculares tornou-se importante.^(2, 3, 4, 5, 7,10)

Esta revisão pretende expor o uso de técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que é altamente sensível e específica para a identificação do parasita, através desta técnica é provável a identificação mais rápida e eficaz de espécies e subespécies de leishmânias. A verdadeira identificação das espécies de *leishmânias* que ocorre em determinadas áreas endêmicas é de suma importância na adoção e medidas de controle bem como nas condutas terapêuticas.^(7,8)

No presente estudo vamos abordar as diferentes técnicas, atualmente utilizadas nos laboratórios para o diagnóstico clínico das leishmanioses e apresentar a Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como uma boa alternativa e um teste de escolha para o diagnóstico precoce das Leishmanioses.

Este artigo foi desenvolvido a partir de estudos exploratórios por meio de pesquisa bibliográfica: artigos. Foram utilizados 15 artigos relacionados ao tema, todos os artigos foram publicados em revistas científicas, todos são nacionais e foram publicados nos últimos 13 anos. (2003-2016). Localizados em bases de dados como SCIELO, BVS e revistas especializadas.

REVISÃO DA LITERATURA

Os parasitas do gênero *Leishmania* são agentes de zoonoses que transmitem doenças infecto parasitárias que acometem eventualmente a espécie humana nas regiões tropicais e subtropicais do velho e do novo mundo, determinando doenças do sistema fagocítico mononuclear ou sistema reticulo endotelial (SRE). As Leishmanioses são doenças que apresentam características clínicas e epidemiológicas diferenciadas. ⁽²⁾

O gênero *Leishmania* envolve protozoários parasitas, com um ciclo de vida heteroxênico alternando-se entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores que compreendem insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos, os quais são responsáveis pela transmissão dos parasitas de mamífero para mamífero. Os hospedeiros mamíferos estão representados na natureza por várias espécies e classes, podemos citar como exemplo os roedores, os marsupiais, os desdentados, os animais domésticos (hospedeiros secundários), o homem (hospedeiro acidental) e outros. ^(1, 2, 10,11)

Nestes hospedeiros vertebrados os parasitas assumem formas amastigotas, que se multiplicam obrigatoriamente nas células do sistema monocítico fagocitário, estas amastigotas se multiplicam dentro dos macrófagos, os quais se rompem liberando inúmeros parasitas na corrente sanguínea que posteriormente são fagocitados por outros macrófagos. Os insetos vetores são hospedeiros intermediários, fêmeas hematófagas de dípteros da subfamília phlebotomiae, pertencentes ao gênero *Lutzomyia* no novo mundo e *Phlebotomus* no velho mundo. Na espécie dos vetores flebotomíneos, as leishmanias assumem formas flageladas indistinguível ao longo do tubo digestivo, que ao realizar o repasto sanguíneo transmite então o parasito ao hospedeiro definitivo. ^(1, 2, 10,11)

Epidemiologia

As Leishmanioses são consideradas como uma das doenças infecciosas com maior incidência no mundo, uma vez que, sua expansão tem sido significativa. De acordo com estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) a Leishmaniose é incidente em 88 países, apenas 30 países realizam a notificação compulsória, mais

de 12 milhões de pessoas encontram-se infectadas e aproximadamente 350 milhões de pessoas estão vulneráveis ao risco de contágio. Os casos de Leishmaniose Cutânea são prevalentes três vezes mais que a Leishmaniose Visceral. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresenta-se de forma endêmica e constitui problema de saúde pública em várias regiões do Brasil e em muitos outros países, nos últimos anos, o ministério da saúde identificou uma média anual de 35 mil novos casos de LTA. A Leishmaniose Visceral é endêmica em quase 62 países dos quatro continentes, em sua maior parte em países em desenvolvimento, onde existem aproximadamente 200 milhões de pessoas vulneráveis ao risco, é uma zoonose que ocasiona grande impacto na população canina e humana, por ser uma doença grave, letal. Sua incidência tem aumentado de uma maneira significativa nos últimos anos. No Brasil, a região metropolitana de Belo Horizonte, dentre várias outras regiões, já é considerada endêmica para Leishmaniose Visceral (LV). (2, 4, 3, 7, 8, 9,12)

Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Nos diversos países subdesenvolvidos, bem como no Brasil, a Leishmaniose Tegumentar apresenta-se de forma endêmica e tem sido causa de grande preocupação para a saúde pública. De acordo com relatos de casos clínicos, podemos observar que é muito difícil obter um diagnóstico precoce da Leishmaniose Tegumentar Americana, o diagnóstico e o tratamento no início da incubação da doença é extremamente importante para combater a mesma, sua acelerada expansão geográfica e suas variadas formas clínicas crônicas podem deixar graves lesões que causam deformidades e refrange o indivíduo no meio psicossocial. Nas diversas regiões endêmicas, a Leishmaniose Tegumentar (LT) se torna um problema para a saúde pública. Sua gravidade persiste em sua elevada incidência e extensa distribuição geográfica. (4,10)

Podem-se identificar até o presente momento seis espécies de *Leishmania* que pertencem aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* como causadoras da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil.

- *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Esta espécie causa lesões cutâneas e mucosas e é a espécie que mais acomete o ser humano. Habita em todas as áreas endêmicas do Brasil, desde o norte até o sul e pode estar associada

aos animais domésticos. A sua transmissão ocorre por diversas espécies de flebotomíneos, como *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia intermedia*, dentre outras. ^(1,2)

- *Leishmania (V.) guyanensis*: Causa lesões cutâneas. Associa-se aos desdentados e marsupiais. Acomete na região norte do Rio Amazonas. As espécies responsáveis pela transmissão são: *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia Anduzei* e *Lutzomyia Whitmani*. ^(1,2)
- *Leishmania (V.) naiffi*: LTA de caráter e evolução benigna acomete na Amazônia, nos estados do Pará e Amazonas e seu reservatório natural é o tatu. Os principais vetores são a *Lutzomyia squamiventris*, *Lutzomyia paraensis* e *Lutzomyia Ayrozai*. ^(1,2)
- *Leishmania (V.) shawi*: É responsável por raros casos na região do Amazônia e Pará e varias espécies de animais silvestres são reservatórios, o vetor é *Lutzomyia. whitmani*. ^(1,2)
- *Leishmania (v.) lainsoni*: Tem como reservatório a paca, acomete apenas no Amazônia e seu vetor é a *Lutzomyia ubiquitalis*.^(1,2)
- *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Agente Etiológico da LTA ou Leishmaniose cutânea difusa tem como reservatório os roedores e marsupiais, seus principais vetores são a *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lutzomyia olmeca*.^(1,2)

Leishmaniose Visceral (LV)

A Leishmaniose Visceral ou Calazar é uma doença recorrente, grave e sistêmica, causada por um protozoário dimórfico *Trypanosomatidae* do complexo *Leishmania denovani* que, nas formas amastigotas atinge as células do sistema mononuclear fagocitário do ser humano é considerada fatal para o homem, os principais órgãos acometidos são o fígado, baço, medula óssea, linfonodos e pele, podem também afetar outros órgãos e tecidos como os pulmões e o intestino. Quando a doença alcança os estágios mais avançados os outros órgãos podem ser invadidos. ^(5,7)

Os principais reservatórios desta doença são os mamíferos da família *Canidae* principalmente os cães (*canis familiaris*) e as raposas. Podem também ser infectados os marsupiais do gênero *Didelphis* e roedores. O principal e o mais

importante vetor hospedeiro e transmissor da LV é o *Lutzomyia longipalpis*, o mesmo está presente em todos os países da América Latina. O Brasil é o país americano que possui maior índice de casos, a LV clássica agride variadas faixas etárias, sendo que sua maior concentração encontra-se nas regiões endêmicas do país, 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com menos de 10 anos de idade. ^(5,7)

Diagnóstico Clínico

O Diagnóstico Clínico da Leishmaniose Tegumentar Americana está associado aos aspectos epidemiológicos do paciente, suas manifestações clínicas depende da interação entre o vetor, a espécie do parasita e a resposta imunológica do hospedeiro que por sua vez apresenta-se de várias formas como já foram citadas acima. ^(1, 2, 4,10)

A Leishmaniose Tegumentar causa uma ulcera indolor com bordas elevadas que se inicia com a inoculação das promastigotas na pele do hospedeiro através da hematofagia de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, infectados. Alguns pacientes podem desenvolver lesões na mucosa, causando graves lesões, deformando o individuo e às vezes quando não tratada adequadamente pode levar a óbito. O comprometimento ósseo quase não ocorre, mas pode sobrevir quando existem lesões cutâneas crônicas. ^(1, 2, 4,10)

O período de incubação pode variar entre 10 dias até 3 meses dependendo do estado imunológico do indivíduo, surge primeiramente uma pápula eritematosa que aos poucos progride-se para um nódulo, depois ocorre a ulceração. 12 a 30% dos pacientes podem desenvolver adenopatia regional com ou sem linfangite. 3 a 5% dos pacientes podem desenvolver metástases para as regiões mucosas. As lesões ocasionadas por parasitos do complexo *Leishmania braziliensis* podem se curar espontaneamente, podem expandir e também metastatizar para a região nazofaringea, derivando na forma cutâneo-mucosa. Até o presente momento não se identificou um método eficaz para o diagnóstico da doença. É necessário associar vários elementos para se obter um diagnóstico final, como aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. ^(1, 2, 4,10)

O diagnóstico Clínico da Leishmaniose Visceral é muito difícil, pois os sintomas clínicos podem ser confundidos com outras doenças presentes na mesma

região onde a Leishmaniose Visceral também é incidente. Os sinais e sintomas clínicos da Leishmaniose Visceral podem estar relacionados com a doença de Chagas, Malária, Febre Tifoide, e também a Tuberculose. Os principais presságios clínicos apresentados por um paciente com Leishmaniose Visceral é febre prolongada, anemia, tosse, dor, perda de peso, hipergamaglobulinemia, hepatomegalia, esplenomegalia, leucopenia, dor abdominal, diarreia e caquexia. A Leishmaniose Visceral é uma doença de desenvolvimento grave e necessita ser diagnosticada precocemente. ^(7,12)

Métodos Laboratoriais para o Diagnóstico das Leishmanioses

Exame Direto

As Análises de amostras humanas e caninas também podem ser realizadas por métodos de exames diretos. Podemos citar entre eles o raspado de pele, a punção de medula óssea ou linfonodos. São técnicas confiáveis quanto à positividade dos casos, porém apresentam baixa sensibilidade por ocasionarem inúmeros falsos negativos em seus resultados. A aspiração ou escarificação, ou a biopsia da borda, corado pelo Giemsa ou Leishman é um dos exames mais comuns e normalmente um dos primeiros a serem utilizados. Trata-se de uma pesquisa direta das formas amastigotas obtidas no material da lesão. Quanto mais antiga a lesão, a probabilidade de encontrar o parasita é menor, quanto mais recente for a lesão, maior a chance de encontrar o parasita, a identificação de granulomas contendo ou não parasitas na análise histopatológica apresenta-se uma sensibilidade adequada, porém este método também não especifica a espécie do parasita. ^(2,4,11,13)

Os meios de cultura quase não são utilizados, pois são métodos que exigem ambientes especializado e pessoal devidamente capacitado, o que os tornam inadequados para estudos epidemiológicos em larga escala. ^(2,7)

Intradermorreação de Montenegro

A Intradermorreação de Montenegro é um teste cutâneo com antígenos de leishmania, realizado através de inoculação intradérmica de um coquetel antigênico,

na parte flexora do antebraço, depois deste procedimento realiza-se a leitura após 48 horas e 72 horas, delimitando-se a área endurecida que deve medir igual ou superior a 5 mm .A amostra é retirada a partir de substâncias de cultura de promastigotas de *Leishmania sp.* , que por sua vez apresentam variados componentes dependendo do agente etiológico de cada região. A utilização do teste de Intradermorreação de Montenegro originou-se em 1926, e ainda é amplamente empregado nos dias atuais por ser um método de baixo custo, é também considerado útil no diagnóstico clínico. O teste tem por base a imunidade ant-leishmania adquirida pelo hospedeiro, detecta a presença de hipersensibilidade tardia, ou seja, não aponta entre contágio agudo e contágio anterior, permanecendo positiva por mais de 19 meses após o tratamento. Mostra-se positivo, em 75% de indivíduos não infectados que vivem em extensões endêmicas. A sensibilidade desta técnica altera de acordo com a forma clínica: cutânea localizada, 82-89%; mucosa e disseminada, quase 100%; difusa apresenta-se negativa. O teste se torna positivo ao longo de 120 dias após o início da lesão e não se diferencia de doença atual ou pregressa. Na maioria dos casos permanece positivo após o tratamento. Nos pacientes imunodeprimidos e nas formas cutâneas difusas apresenta-se negativo. Embora seja um método muito utilizado nas investigações epidemiológicas. (2,4,10,11)

Técnicas Sorológicas

Dentre os exames sorológicos a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) são considerados testes de escolhas para inquéritos epidemiológicos populacionais, são os métodos mais utilizados, entretanto os testes diferem tanto na sensibilidade, quanto na especificidade, nas condições laboratoriais e na disponibilidade de materiais, tais como reagentes. Existe também a possibilidade de sofrer reações cruzadas, principalmente com o *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de chagas e com a *Leishmania chagasi*, agente causador da leishmaniose visceral. (2)

Na leishmaniose Tegumentar Americana a RIFI apresenta variação em seus resultados, esta variação ocorre em consequência do parasita possuir baixa antigenicidade e reduzidos níveis de anticorpos circulantes. Geralmente na forma Cutânea Difusa os resultados apresentam-se negativos. Estima-se que, na forma mucosa sua sensibilidade é de 100% e nas formas cutânea difusas 71%. Nos casos

recentes que variam de um a seis meses de evolução das lesões, o teste normalmente mostra negatividade sorológica. Pacientes com múltiplas lesões apresentam maior índice de antigenicidade devido ao número maior de parasitas circulantes na corrente sanguínea, os testes normalmente apresentam-se positivos.

(2)

Os testes sorológicos ELISA, RIFI, Aglutinação Direta e outros detectam anticorpos anti-leishmania presentes no soro de pacientes com Leishmaniose Tegumentar, esses métodos também dependem de uma estrutura laboratorial adequada e pessoal devidamente capacitado, por esta razão não são rotineiramente utilizados na clínica médica. Os números de reações sorológicas negativas são mais incidentes que as reações sorológicas positivas quando comparados em pesquisas.

(4,10)

Nos diagnósticos da Leishmaniose Visceral Humana e Canina, a RIFI e ELISA são testes especialmente utilizados, são diferenciados em sua sensibilidade e especificidade. A sensibilidade da RIFI varia entre 90% e 100% e sua especificidade 80% para as amostras sorológicas, mas pode ocorrer reações cruzadas com Leishmaniose Tegumentar, Chagas, Malária, Esquistossomose e Tuberculose Pulmonar, além disso, a técnica exige uma estrutura laboratorial adequada e pessoal capacitado, por ser uma técnica onerosa a mesma não está apta para inquéritos epidemiológicos de larga escala.^(7,11,14)

O teste de ELISA é bastante utilizado no diagnóstico da Leishmaniose Visceral. O teste é mais sensível e menos específico que a RIFI, o teste ELISA detecta baixos títulos de anticorpos, mas sua precisão é menor na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos. Apresenta ser um teste rápido de fácil execução e leitura.^(7,12)

Nos testes diagnósticos utilizam-se normalmente antígenos derivados de promastigotas cultivadas em meios de cultura, moléculas solúveis ou parasitas incólumes. Contudo, estes antígenos apresentam reações cruzadas com antígenos de outros tripanossomatídeos. Para obter-se um diagnóstico mais específico, houve a necessidade de expandir a pesquisa de elementos antigênicos purificados. Já foram identificados antígenos com massas moleculares diversificadas, como exemplo o antígeno anti-66kDa que possui 100% de especificidade e 37% de sensibilidade.^(5,12)

O rk39 é outro antígeno de *leishmania*, da família das *kinesinas*, tem se mostrado 100% de especificidade e 98% de sensibilidade quando empregado no teste ELISA. É um antígeno recombinante que está sendo estudado e já foi testado no Brasil, é também um antígeno específico para as espécies do complexo *Leishmania denovani*. Este antígeno possui principalmente uma característica muito importante, ele pode ser aplicado em pacientes portadores de HIV, pois os níveis de anticorpos contra os antígenos rk39 caem ligeiramente de acordo com a melhora positiva do tratamento. ^(5,12)

Já foi desenvolvido um teste imunocromatográfico rápido e simples aplicado em soro ou sangue do paciente utilizando o rk39 fixado em papel, o teste foi testado na Índia, apresentando 100% de sensibilidade e no Sudão com 67% de sensibilidade. Porém, o teste apresentou reação cruzada com malária, febre tifoide e tuberculose. ^(5,12)

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A partir da década de 80 muitos estudos fundamentados em técnicas moleculares foram desenvolvidos para a detecção e a identificação exata dos parasitas do gênero *leishmania*. Os métodos laboratoriais anteriormente citados são extremamente criteriosos e necessitam de pessoal capacitado para a sua execução. São métodos que necessitam de um longo intervalo de tempo para a obtenção dos resultados. Os métodos moleculares foram desenvolvidos mediante estas dificuldades. ⁽⁴⁾

Os Testes sorológicos, exames direto de esfregaços ou impressão por oposição, ou testes cutâneos com antígenos de *Leishmania* (Reação de Montenegro) são testes que dependem da identificação de amastigotas encontradas em amostras de tecidos coradas por *Giemsa* ou *Leishman*, que por sua vez podem ser avaliadas por isolamento de promastigotas em meio de cultura ou através de microscopia óptica. A microscopia direta do esfregaço ou impressão demonstra uma variável de 50% à 70% de sensibilidade, ou seja, sensibilidade baixa. ⁽⁴⁾

Estes métodos confirmam o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar, porém não identificam especificamente a espécie do parasita, os casos de Leishmaniose Tegumentar causados por *Leishmania braziliensis* manifestam-se com maior

importância clínica, podendo ocasionar frequentes falhas no tratamento convencional. ⁽⁴⁾

Geralmente os casos de leishmanioses apresentam uma baixa carga parasitária presentes na lesão, ocasionando uma baixa sensibilidade desses métodos apresentam 100% de sensibilidade nos dois primeiros meses, 75% de sensibilidade aos seis meses e 20% de sensibilidade acima de um ano. Portanto, a identificação da leishmania infectante é imprescindível para o prognóstico. ⁽⁴⁾

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica altaneiramente sensível e exclusiva, e pode detectar o DNA ou RNA do parasita, em diagnóstico humano, canídeo e em flebotomíneos, sendo ao mesmo tempo proveitoso na diferenciação de isolados humanos. O DNA de cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* tem sido empregado como uma ferramenta de diagnóstico pela PCR, pela competência de detectar pequenos fragmentos de DNA do parasito em materiais biológicos, pelo qual se deve à abundância de minicírculos. ^(2,6,8)

A Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica *in vitro*, que aceita a ampliação de seguimentos específicos de DNA ou RNA. Devido ao número de múltiplos clones e a composição por regiões conservada e variáveis, os minicírculos do kDNA, atualmente, tem sido os alvos moleculares mais empregado para a detecção de DNA de *Leishmania*. ^(2,6,8)

Inúmeros exames de PCR foram estudados para a identificação de leishmanias em amostras, os quais mostraram especificidade diferenciada, alguns identificaram a espécie do parasita, os ensaios testados substanciaram a amplificação de genes de RNA ribossomal, de gene de Miniexon, de DNA de cinetoplasto e de sequencias de DNA repetitivo. ^(4,12)

A PCR é muito importante para o diagnóstico da leishmaniose Tegumentar Americana, a confirmação parasitológica possibilita o tratamento. Esta técnica mostrou ser uma ferramenta muito eficiente para prover informações lógicas aos estudos clínicos e moleculares para a leishmaniose mucosa, pois é uma técnica com alta especificidade, sensibilidade e agilidade quando comparada as técnicas convencionais, permitindo a detecção do parasito antes mesmo de demonstrarem a sintomatologia da moléstia. ^(2, 4, 6, 8,)

A PCR é uma técnica rápida que tem auxiliado no diagnóstico da leishmaniose mucosa, a técnica fornece informações que são relevantes para os estudos clínicos e moleculares da espécie possibilitando assim a detecção do

parasito antes de se manifestar os sintomas da doença. Os métodos convencionais demonstram sensibilidade variada ou pouca sensibilidade, quanto mais rápido a detecção do parasita, mais eficaz se torna o tratamento, uma vez que a leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania braziliensis* apresentam escassos parasitas na lesão, dificultando o diagnóstico, gerando erros, atrasando o tratamento e ocasionando preocupação, uma vez que estes parasitas migram para as áreas mucosas causando leishmaniose mucocutânea. ^(2, 4, 6,8)

De acordo com estudos realizados, a técnica de PCR apresentou se positiva em 100% das biopsias de pele em pacientes com Leishmaniose Tegumentar apresentando uma positividade de 100%, logo após o diagnóstico todos os pacientes apresentaram cura clínica após realização do tratamento. Nesse mesmo estudo a PCR apresentou 100% de especificidade, pois não houve achado do produto de amplificação em biopsias obtidas de pacientes com lesões cutâneas causadas por outras enfermidades, neste caso a PCR constatou o DNA de parasitas em 97,1% dos casos, confirmando que a PCR é o melhor método diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar em comparação à confirmação parasitológica por meio de métodos sorológicos, isolamento de parasitas em meios de cultura e microscopia direta. A PCR é uma técnica que identifica a espécie do parasita presente nas lesões, facilitando assim o diagnóstico. ^(4,7)

A PCR é um método que aceita amplificar em linha graduada exponencial sequencias de DNA. Dotada de elevada sensibilidade, é apta para detectar quantidades tão pequenas quanto 1 fentograma (1 fentograma = 10^{-15} g) do DNA de uma leishmânia, o equivalente a 1/10 do parasita. ^(2, 4, 6,8)

A Técnica de PCR exige a necessidade de equipamentos apropriados e de alto custo, porém é um método de simples processamento de amostra, de fácil coleta, de alta especificidade e positividade, esses indicadores contribuem para que a PCR futuramente possa ser um método de escolha para o diagnóstico da Leishmaniose mucocutânea. Diversos tipos de amostras biológicas, bem como aspirados esplênicos, de medula óssea, de linfonodos, sangue total, camada leucocitária, cultura e sangue colhido em papel-filtro podem ser usados como fonte de material para as reações, sendo uma das vantagens da PCR. A utilização do sangue periférico se torna mais fácil e vantajoso, por ser um procedimento menos invasivo, mas é capaz de resultar uma menor sensibilidade do teste devido à baixa parasitemia dos animais contaminados. ^(4,12,15)

O DNA presente nos minicírculos de cinetoplastos (kDNA) de uma determinada região preservada ou a amplificação do minicírculo completo tem sido o melhor alvo para a PCR e as sondas de DNA. Vários pesquisadores tem como base a amplificação de fragmento da região preservada do minicírculo de kDNA existente em 10.000-20.000 cópias e por apresentar a amplificação da região mantida 10 vezes mais sensível que a da região variável.^(7,12)

Em razão da biopsia esplênica e da punção da medula óssea serem técnicas inadequadas para a utilização fora do âmbito hospitalar, vários centros de pesquisa utilizam o sangue periférico para a avaliação do diagnóstico da Leishmaniose Visceral utilizando a técnica de PCR, além do diagnóstico, esta técnica tem sido empregada no monitoramento do tratamento e estudos epidemiológicos da Leishmania Visceral. Entretanto, é um método que permite sua utilização com maior frequência em estudos epidemiológicos do que em diagnósticos de rotina. Em estudos epidemiológicos de larga escala adaptações são necessárias para se tornar mais acessível e com custo operacional econômico.^(7,12)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos recursos de técnicas biomoleculares disponíveis para a realização do diagnóstico antecipado das leishmanioses, doenças que tem causado impacto em vários países, os profissionais de saúde devem ser criteriosos e ter conhecimento para escolher os principais métodos. Novas técnicas estão sendo pesquisadas com o objetivo de alcançar o diagnóstico precoce.

O uso da PCR representa uma boa alternativa para o diagnóstico específico e positivo das espécies de leishmania e suas respectivas leishmanioses. Estudos literários comprovam que a detecção de DNA de leishmania em inúmeras amostras cutâneas por PCR apresentam 100% de especificidade como também possibilita o diagnóstico da espécie e subespécie responsável pela doença. Essa é uma grande vantagem que a técnica de PCR proporciona uma estimativa do prognóstico e do retorno terapêutico, relacionada aos demais métodos, viabilizando as decisões dos profissionais de saúde na continuidade do tratamento.

Nos casos de Leishmaniose visceral a técnica de PRC tem sido utilizada, além do diagnóstico, no monitoramento do tratamento e nos estudos epidemiológicos.

É necessária uma intervenção dos profissionais de saúde juntamente com políticas públicas de saneamento competente, ampliar a disponibilidade desses métodos com o objetivo de diagnóstico e intervenção terapêutica precoce, reduzindo a partir destas iniciativas os danos causados por esta doença infecciosa.

REFERÊNCIAS

1-Paiva BR, Secundino NFC, Pimenta PFP, Galati EAB, Junior HFA, Malafronte RS. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. Em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. *Cad saud pub.*2007; 23(1):87-94.

2- Gontijo B, carvalho MLR,. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Soc Bras Med Trop.*2003;36(1):71-80.

3- Garcia FCB, Medeiros ACR, Santos SSR, Roselino AMF, Chociay MF. Métodos subsidiários para o diagnóstico da leishmaniose Tegumentar Americana (LTA); Comparação dos resultados do seqüenciamento de DNA e da PCR- RFLP para determinação da espécie de Leishmaniose em amostras cutâneas mucosas. *Rev Bras Dermatol.* 2005;80(supl 3):s 339- s 344.

4-Garcia FCB, Medeiros ACR, Santos SSR, Roselino AMF, Chociay MF. Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, falácias e Perspectivas. *Gaz Med Bahia.*2005;75(1):75-82.

5- Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafio e Perspectivas. *Rev. Bras Parasitol veter.* 2004;23(1):41-45.

6- Junior MSCL, Andreotti R, Dorval NEMCD, Oshiro ET, Oliveira AG, Matos MFC. Identificação de Espécies de *leishmania* Isoladas de Casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da Reação em Cadeia da Polimerase. *Rev. Soc Bras Med trop.* 2009;42(3):303-308.

- 7- Gontijo CMF, Melo NM. Leishmaniose Visceral no Brasil:Quadro atual, desafios e perspectivas. Rev. Brasil epidemiol. 2004;7(3):338-349.
- 8- Gomes JS, Oliveira FS, Cardoso SV, Pacheco RS. Importância da Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no Diagnóstico específico de Leishmaniose Tegumentar Americana. Rev Uniab Belf Rox.2015;8(20):337-349.
- 9- Pereira MR, Rocha FS, Melo CG, Lafuente S, Magalhães T, Caligiorne RB. Aplicação das Técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (CPCR) e em tempo Real (QPCR) para detecção do genoma leishmania sp. em amostras biológicas.Rev Saud pub do SUS/MG.2013;1(1):55-56.
- 10- Bentes AA, Rodrigues DE, Carvalho E, Carvalho AL, Campos FA, Romanelli RMC. Leishmaniose Tegumentar Americana: Um desafio Diagnóstico na Prática Pediátrica. Rev. Med Minas Gerais. 2013;25(supl 6):583-587.
- 11-Murback NDN, Nascimento RAF, Dorval MEMC,Filho GH, Nakazato KRO. Leishmaniose Tegumentar Americana: Estudo Clínico Epidemiológico e Laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.An Bras Dermatol.2011; 86(1):55-63.
- 12- Souza YCP, Carvalho AFS, Carvalho LAR, Mansur VFR. Testes diagnósticos para Leishmaniose Visceral- Atualidades e Perspectivas. Rev. cient eletro med Vet.2013;1(1):1-16.
- 13- Winter LMF. Descrição e Utilização de Alvos Moleculares para identificação de Leishmania por PCR. Bepa. 2010;7(73):21-27.
- 14- Matos HJ, Pinto AYN, Miranda AMM, Silva FLC, Ramos FLP. Reação Cruzada nos Testes Sorológicos entre Doença de Chagas e Leishmaniose Visceral em Regiões Endêmicas para ambas as doenças.Rev pan Amaz saúde. 2005;6(1):51-54.
- 15- Cova OB, Ferreira FS, Souza OMF, Santos OGS, Fonseca EOL, Ribas JLL. Padronização das Condições para extração automatizada do DNA de Flebotomíneos no Laboratório Central de Saúde Pública da Bahia. Rev Bahia sald publ. . 2005;39(1):125-1

AGRADECIMENTOS

Deixo expressa a minha gratidão primeiramente a Deus, sem a presença Dele em minha vida seria impossível a realização deste artigo, ao meu orientador pelo apoio, orientação e incentivo, a minha professora de Trabalho de Conclusão de Curso por me auxiliar em cada etapa do desenvolvimento deste trabalho, aos demais professores, aos colegas e a toda equipe da instituição pelo apoio.

Data de entrega do artigo para a banca: 24/10/2016