

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical

Avaliação de dois métodos de extração de DNA em amostras obtidas por *swab* associados às técnicas moleculares de PCR convencional, PCR em tempo real e LAMP para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar

Por

Verônica Cardoso Santos de Faria

Belo Horizonte
2020

Verônica Cardoso Santos de Faria

Avaliação de dois métodos de extração de DNA em amostras obtidas por *swab* associados às técnicas moleculares de PCR convencional, PCR em tempo real e LAMP para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina da UFMG, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre no referido Programa.

Linha de pesquisa: Leishmanioses

Orientadora: Prof. Dra. Denise Utsch Gonçalves
Coorientador: Prof. Dr. Daniel Moreira de Avelar

Belo Horizonte
2020

F224a Faria, Verônica Cardoso Santos de.
Avaliação de dois métodos de extração de DNA em amostras obtidas por swab associados às técnicas moleculares de PCR convencional, PCR em tempo real e LAMP para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar [recursos eletrônicos]. / Verônica Cardoso Santos de Faria. -- Belo Horizonte: 2023.
108f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Denise Utsch Gonçalves.
Coorientador (a): Daniel Moreira de Avelar.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Leishmaniose Tegumentar Difusa. 3. Técnicas de Diagnóstico Molecular. 4. DNA. 5. Dissertação Acadêmica. I. Gonçalves, Denise Utsch. II. Avelar, Daniel Moreira de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WR 350

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E
MEDICINA TROPICAL

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Avaliação de dois métodos de extração de DNA em amostras obtidas por swab associados às técnicas moleculares de PCR convencional, PCR em tempo real e LAMP para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar"

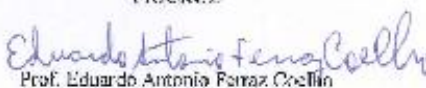
VERÔNICA CARDOSO SANTOS DE FARIA

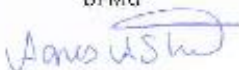
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.

Aprovada em 17 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:


Prof.ª Denise Utsch Gonçalves - Orientadora
UFMG


Prof. Daniel Moreira de Avelar - Convidado
FIOCRUZ


Prof. Eduardo Antonio Feres Coelho
UFMG


Prof.ª Agnes Antônia Sampaio Pereira
FIOCRUZ/MG

Belo Horizonte, 17 de fevereiro de 2020.

Universidade Federal de Minas Gerais

Reitor: Prof^a. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-reitora: Prof. Dr. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-reitor de pós-graduação: Fábio Alves da Silva Junior

Pró-reitor de pesquisa: Prof. Dr. Mário Fernando Montenegro Campos

Faculdade de Medicina

Diretor: Prof. Dr. Humberto José Alves

Vice-diretora: Prof^a. Dra. Alamanda Kfoury Pereira

Coordenador do centro de pós-graduação: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Subcoordenador do centro de pós-graduação: Prof^a. Dra. Eli Lola Gurgel Andrade

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Área de Concentração: Infectologia e Medicina Tropical

Coordenador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Vice-coordenador: Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Membros Titulares do Colegiado da Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical

Prof. Dr. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Junior

Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Prof^a. Dra. Mariângela Carneiro

Prof^a. Dra. Mariana Costa Duarte

Grasiele de Sousa Vieira Tavares (Representante Discente)

Colaboradores:

Dra. Gláucia Cota

MSc. Rosiana Estefane da Silva

Hugo Silva Assis Moreira

Ana Paula Baeta Melo

Apoio Financeiro:

Agências de fomento FAPEMIG e CNPq

Dedico:

À minha irmã Denise, que sempre me apoia
na realização dos meus sonhos.

Ao Daniel, orientador magnífico e grande
amigo nessa jornada.

Essa conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar e dar forças durante a caminhada. Eu sei o quanto sou abençoada!

Ao meu pai e à Luci, por todo amor e incentivo, mesmo sem entenderem ao certo meu trabalho. À minha irmã Denise, pelo apoio incondicional, amor, força e estrutura emocional. Ao meu cunhado Gustavo, pela amizade e pelas sobremesas que me alegraram nessa jornada. Amo vocês!

Aos meus queridos orientadores, Dra. Denise Utsch e Dr. Daniel Avelar, por quem tenho enorme admiração. Obrigada por transmitirem o conhecimento de vocês de forma tão didática, carinhosa e paciente. Obrigada pela confiança, pela excelente convivência, pela dedicação para com nosso trabalho e conselhos durante a caminhada. Vocês foram essenciais e verdadeiros orientadores! Agradeço ainda por me fazerem acreditar na minha capacidade de seguir em frente... e que sigamos juntos!

À Dra. Gláucia Cota, pela colaboração, mas principalmente pelo carinho e por estar sempre tão disposta a ajudar.

Aos colaboradores do Grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias e Ambulatório Alda Falcão do Instituto René Rachou pela prazerosa convivência diária e por toda ajuda e troca de experiências. Em especial, ao Dr. Edward, à Rosi e à Lara, que por muitas vezes me ajudaram com a maior atenção e disposição.

A todos do ambulatório de otorrino do Hospital São Geraldo/HC, pela parceria e amizade. Em especial à Fernanda e à Grasielle.

Aos meus amigos e familiares que compreenderam minhas muitas ausências.

Aos meus grandes amigos Aninha (gema), Fernanda, Aline, Paula, Ana Paula, Víctor e Vinícius, que estiveram sempre ao meu lado, me apoiando e amando os tubinhos coloridos.

Ao Antônio, professor e amigo, que devido aos seus ensinamentos e incentivo me apaixonei pela biologia molecular e me aventurei nos caminhos da pós-graduação.

Ao “Pessoal do Serviço”, segunda família e amigos do coração. Sem vocês nada disso seria possível. Agradeço imensamente ao Arthur pelos ensinamentos e ajuda nos experimentos, ao Pedro por toda colaboração, à Carol, Ju, Lindi e Mari pela amizade de todas as horas (e dias) e por tanto carinho, apoio e ajuda. E a todos integrantes dessa “família muito unida e também muito ouriçada...” Obrigada por caminharmos juntos: Eliza, Lara, Daniel, Sabrina, Rosi, Thana, Karine, Dian, Diana, Bruna, Jussara, Paulinho e Nayara.

Ao Felipe Dutra, por gentilmente nos ceder amostras de cepas de referência de *Leishmania*.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e ao Instituto René Rachou, por possibilitarem a realização deste trabalho.

E, por último, mas não menos importante, aos colaboradores do CDF e a todos que lá estiveram brindando a vida comigo. Em todos esses anos de René Rachou, Afonso e os demais colegas foram grandes parceiros nas angústias e, principalmente, nas comemorações.

Obrigada!

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”.

Carl Jung

RESUMO

Introdução: A leishmaniose tegumentar (LT) possui um arsenal diagnóstico limitado e envolve o uso de amostras coletadas de forma invasiva. A pesquisa de DNA de *Leishmania* no material coletado por *swab* pode ser uma estratégia minimamente invasiva e precisa para o diagnóstico molecular da LT. A acurácia dos ensaios moleculares pode variar dependendo do tipo de amostra e do método de extração de DNA utilizado. Os parâmetros de qualidade e rendimento do DNA extraído são pontos críticos para a detecção e a identificação de espécies de *Leishmania* por amplificação de ácidos nucleicos. **Objetivo:** Avaliar comparativamente dois métodos de extração de DNA: PureLink™ Genomic DNA mini kit e a técnica Direct Boil (DB) em amostras obtidas por *swab* de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM) e avaliar a aplicabilidade dessas amostras para detecção molecular e genotipagem de *Leishmania*. **Métodos:** Vinte e seis pacientes confirmados para LT (13 LC e 13 LM) oriundos dos ambulatórios do Instituto René Rachou/FIOCRUZ e do Hospital das Clínicas/UFMG foram avaliados. Todos tiveram o diagnóstico confirmado por cPCR kDNA em amostras obtidas por biópsia. O rendimento e a qualidade do DNA, em amostras obtidas por *swab* e biópsia, foram medidos por espectrofotometria e a integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida. O DNA extraído foi avaliado através de quatro testes moleculares de diagnóstico (cPCR kDNA, qPCR TaqMan® SSU rRNA; qPCR SYBR® Green kDNA; e LAMP-RT 18S) e uma técnica molecular para genotipagem (hsp70 PCR-RFLP). Para quantificação indireta da carga parasitária foi realizada a análise dos valores de ciclo limiar (Ct) pelo qPCR SYBR® Green kDNA. **Resultados:** O protocolo DB resultou no maior rendimento de DNA (196 ng/μL – LM; 95,6 ng /μL – LC) em comparação ao kit comercial. O protocolo do kit comercial produziu a mais alta qualidade genômica usando a razão A260/A280 para a pureza do DNA (LM: 1,81 ng/μL; e LC: 1,93 ng/μL). Ambos os métodos de extração apresentaram valores de absorvância fora do padrão recomendado na análise da razão A260/A230 e a técnica DB teve o pior resultado (LM: 0,42; CL: 0,3). A integridade do DNA foi afetada em 92,3% das amostras (LC e LM) obtidas por *swab* e extraídas pela técnica DB. A integridade do DNA foi mantida na maioria das amostras obtidas por *swab* e extraídas pelo kit Purelink™, com desempenho idêntico ou mais alto em todas as técnicas moleculares realizadas na comparação com os testes com amostras obtidas por biópsia. Somente no cPCR kDNA com amostras de LC, o desempenho das amostras coletadas por *swab* e extraídas pela técnica DB foi idêntico quando comparado à extração do *swab* utilizando o kit comercial. O qPCR TaqMan® SSU rRNA realizado nas amostras obtidas por *swab* juntamente com a extração de DB mostrou os piores resultados de sensibilidade para LC (46%) e LM (23%). A única espécie encontrada em todas as amostras analisadas foi a *Leishmania braziliensis*, e a caracterização genotípica teve o melhor resultado em amostras coletadas por *swab* e extraídas pelo kit comercial para LC e em amostras obtidas por biópsia para LM. **Conclusão:** O uso do *swab* como método de amostragem minimamente invasivo pode ser uma alternativa de baixo custo para o diagnóstico molecular da LT, tendo grande aplicabilidade para regiões remotas. Para a LC, o uso do *swab* associado à extração por kit comercial apresentou elevado desempenho independente da técnica molecular utilizada; enquanto que para a LM esta associação apresentou melhor sensibilidade na cPCR kDNA. A utilização da técnica DB para extração de *swabs* requer atenção, pois a sensibilidade das técnicas moleculares avaliadas apresentou grande variação. A precisão geral dos métodos de extração e técnicas moleculares usando *swab* deverá ser analisada em maior grupo amostral, o que poderá confirmar a aplicabilidade dessa estratégia não invasiva para o diagnóstico e caracterização das espécies causadoras da doença.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea, Leishmaniose mucosa, *Swab*, Direct boil, Diagnóstico molecular, Qualidade do DNA.

ABSTRACT

Background: Tegumentary leishmaniasis (TL) has a limited diagnostic arsenal and involves the use of invasively collected specimens. The *Leishmania* DNA search on swab-collected material may be a minimally invasive and accurate strategy for the molecular diagnosis of TL. The accuracy of molecular assays can be affected depending on the type of sample and the DNA extraction method used. The extracted DNA quality and yield parameters are critical points for detection and identification of *Leishmania* species by nucleic acid amplification. **Objective:** To compare two DNA extraction methods (PureLink™ Genetic DNA Mini-Kit and Direct Boil - DB technique) in swab samples from patients with CL and ML, and the use of these samples for molecular detection and genotyping of *Leishmania*. **Methods:** Twenty-six patients with TL (13 CL and 13 ML) coming from outpatient clinics of the Instituto René Rachou /FIOCRUZ and the Hospital das Clínicas/UFMG were evaluated. All cases had their diagnosis confirmed by kDNA cPCR in biopsy samples. DNA yield and quality in swab samples were measured by spectroscopy and DNA integrity was assessed by polyacrylamide gel electrophoresis. The extracted DNA was tested by four molecular diagnostic tests (kDNA cPCR, SSU TaqMAN qPCR; kDNA SYBR-qPCR; and rRNA LAMP-RT 18S) and a molecular test for genotyping (hsp70 PCR-RFLP). For indirect quantification of parasitic load, an analysis of threshold cycle (CT) values was performed by SYBR qPCR kDNA. **Results:** The DB protocol resulted in the highest DNA yield (196 ng/μL - ML; 95.6 ng/μL - CL) as compared to the commercial kit. The commercial kit protocol gave the highest genetic quality using an A260/A280 ratio for DNA purity (ML: 1.81 ng / μL; and CL: 1.93 ng/μL). Both extraction methods presented non-standard absorbance values recommended in the A260/A230 ratio analysis, and DB technique had the worst result (ML: 0.42; CL: 0.3). The DNA integrity was affected in 92.3% of swab samples (CL and ML) extracted by DB technique. The DNA integrity was maintained in most samples obtained by swab and extracted by the Purelink™ kit, with identical or higher performance in all molecular techniques performed in comparison with tests with samples obtained by biopsy. Only in kDNA cPCR with samples from CL cases, the performance of samples collected by swab and extracted by the DB technique was identical when compared to swab extraction using the commercial kit. TaqMan SSU rRNA qPCR performed using swab together with DB extraction showed the worse sensitivity results for CL (46%) and ML (23%). *Leishmania braziliensis* was the only specie found in all analyzed samples, and the genotypic characterization have a best performance in samples collected by swab and extracted by the commercial kit for CL and in biopsy samples for ML. **Conclusion:** The use of swab as a minimally invasive sampling method can be a low-cost alternative for the molecular diagnosis of TL, having great applicability to remote regions. For CL, the use of swab coupled with extraction by commercial kit showed high performance regardless of the molecular technique used; while for ML this association showed better sensitivity in cPCR kDNA. The use of the DB technique for swab extraction requires attention, as the sensitivity of the molecular techniques evaluated varied widely. The general precision of the extraction methods and molecular techniques using swab should be analyzed in a larger sample group, which may confirm the applicability of this non-invasive strategy for the diagnosis and characterization of the species causing the disease.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis; Mucosal leishmaniasis; Swab; Direct boil; Molecular diagnostic; Quality of DNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxograma do diagnóstico das formas cutânea e mucosa da leishmaniose tegumentar.	28
Figura 2 Fluxograma geral do delineamento do estudo	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Características patogênicas da leishmaniose tegumentar no Brasil.....	26
Quadro 2 Visão geral dos testes moleculares para diagnóstico de leishmaniose cutânea e mucosa utilizados em estudos anteriores no Novo Mundo.....	42
Quadro 3 Informações dos alvos e oligonucleotídeos utilizados nas técnicas moleculares.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cPCR	Reação em cadeia da polimerase convencional
DB	do inglês <i>Direct Boil</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimático
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
hsp70	Proteína de choque térmico de setenta kilodaltons
IC	Intervalo de Confiança
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFN-γ	Interferon-gama
IRR	Instituto René Rachou
ITS	Espaçador Interno transcrito (do inglês <i>Internal Transcribed Spacers</i>)
KDNA	DNA do Cinetoplasto
LAMP	Amplificação Isotérmica de DNA mediada por loop (do inglês <i>Loop-mediated isothermal amplification</i>)
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCR	Leishmaniose cutânea recidivante
LD	Leishmaniose cutânea disseminada
LIT	do inglês <i>Liver Infusion Tryptose</i>
LM	Leishmaniose mucosa
LRV1	<i>Leishmania</i> RNA virus 1
LT	Leishmaniose tegumentar
MS	Ministério da Saúde do Brasil
NASBA	Amplificação Baseada na Sequência de Ácidos Nucléicos (do inglês <i>Nucleic Acid Sequence-based Amplification</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCPP	Grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCR-RFLP	Reação em Cadeia da Polimerase seguida (do inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (<i>PCR real time</i>)
rDNA	DNA ribossômico
RNA	Ácido Ribonucleico
RPA	Amplificação isotérmica da recombinase polimerase (do inglês <i>Recombinase Polymerase Amplification</i>)
rRNA	RNA ribossomal
SSU	Subunidade menor do ribossomo (do inglês <i>Small subunit ribosomal</i>)
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
T_m	Temperatura de <i>melting</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE SÍMBOLOS

Kg	Quilograma
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Micromolar
nm	Nanomolar
ng	Nanogramma
μL	Microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	14
2 INTRODUÇÃO	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Aspectos gerais.....	18
3.2 Diagnóstico clínico e imunopatogênese	21
3.2.1 Diagnóstico clínico e imunopatogênese da LC	21
3.2.2 Diagnóstico clínico e imunopatogênese da LM	23
3.3 Diagnóstico laboratorial.....	26
3.3.1 Avaliação do paciente e obtenção de material biológico.....	26
3.3.2 Métodos diagnósticos	28
3.3.2.1 Métodos imunológicos.....	28
3.3.2.2 Métodos histopatológicos.....	30
3.3.2.3 Métodos parasitológicos.....	31
3.3.2.4 Métodos moleculares	32
a) Métodos de extração e qualidade do material genômico	33
b) Técnicas moleculares.....	35
4 OBJETIVOS	48
4.1 Objetivo geral.....	48
4.2 Objetivos específicos	48
5 MATERIAL E MÉTODOS	49
5.1 Delineamento do estudo e considerações éticas	49
5.2 Coleta e preparação das amostras clínicas	50
5.3 Métodos de extração de DNA	51
5.4 Controle de qualidade do DNA.....	53
5.5 Métodos moleculares para amplificação do DNA de <i>Leishmania</i> e identificação de espécies.....	53
5.5.1 Condições gerais utilizadas nas técnicas moleculares.....	54
5.5.2 Condições de amplificação dos testes moleculares.....	54
5.5.3 Análise dos produtos amplificados.....	56
5.5.4 Identificação de espécies.....	57
5.6 Análise estatística	57
6 RESULTADO E DISCUSSÃO	59
6.1 Artigo.....	59
7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	86
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
REFERÊNCIAS	88
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	102
ANEXO A – Aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa	105

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Esta dissertação de mestrado teve como objetivo geral avaliar dois métodos de extração de DNA em amostras obtidas por *swab* associados às técnicas moleculares de PCR convencional (kDNA e hsp70 RFLP), PCR em tempo real (TaqMan[®] SSU rRNA e SYBR[®] Green kDNA) e LAMP-RT 18S para o diagnóstico de pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar (LT). A escolha do tema ocorreu devido à necessidade de se melhorar o arsenal diagnóstico atualmente disponível para LT, uma vez que os testes atuais são limitados e apresentam deficiência na acurácia. Além disso, as amostras clínicas são obtidas de forma invasiva.

Em 2015, iniciei minhas atividades no Grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas (PCPP) do Instituto René Rachou (IRR/FIOCRUZ). Contratada como apoio técnico, participei do projeto intitulado “Estudos estratégicos para inovação e desenvolvimento tecnológico em diagnóstico e terapêutica em doenças negligenciadas”, coordenado pela Dra. Ana Rabello. Minhas atividades estavam relacionadas ao desenvolvimento e atualização de relatórios de doenças negligenciadas como filariose linfática, oncocercose, LT, dentre outras. Essa experiência foi de grande importância no meu amadurecimento profissional. Na pesquisa, minhas experiências anteriores a essa são ligadas a estudos experimentais com biologia molecular, na Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e no Ministério da Agricultura (MAPA/Lanagro).

Durante a realização deste trabalho no IRR, conheci outras pesquisas que vinham sendo realizadas pelo grupo. O coorientador deste mestrado, Dr. Daniel Avelar é pesquisador vinculado ao PCPP e atua, principalmente, nas pesquisas em diagnóstico molecular para leishmanioses. Logo, me despertou o interesse em trabalhar e realizar a pós-graduação sob a orientação dele nessa área.

O PCPP está diretamente ligado ao ambulatório Alda Falcão e Centro de Referência em Leishmanioses do mesmo instituto. O diagnóstico da leishmaniose mucosa realizado no IRR acontece em parceria com a orientadora deste trabalho, Dra. Denise Utsch e que atua no ambulatório de otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas/Universidade Federal de Minas Gerais, anexo São Geraldo.

Também devido a essa parceria, ingressei no programa de pós-graduação em Medicina Tropical da UFMG, no qual a Dra. Denise atua na linha de pesquisa “Leishmanioses”. Durante o desenvolvimento do mestrado, acompanhei atendimentos nos dois ambulatórios, nos quais tive a oportunidade de adquirir conhecimento da prática clínica, da história médica pregressa de cada paciente e, coletar pessoalmente grande parte das amostras utilizadas neste trabalho. Os testes experimentais foram realizados no PCPP/IRR por mim e por colegas colaboradores do mesmo grupo de pesquisa.

O trabalho foi apresentado em encontros e congresso nacional. Além disso, possibilitou a produção de um artigo científico a ser submetido em revista de relevante impacto internacional, que será apresentado neste volume. Optamos por aguardar as contribuições da banca examinadora, que muito acrescentarão na qualidade do artigo, para posterior submissão. O artigo está formatado para ser submetido a revista *Parasitology* (Qualis A2).

A apresentação deste documento foi realizada de acordo com a Resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013; que regulamenta o formato dos trabalhos finais e de qualificação, estabelecendo condições para a marcação das defesas de teses e dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG.

2 INTRODUÇÃO

Conhecida como um complexo de doenças que acometem principalmente populações negligenciadas, a LT possui medidas de controle que envolvem questões políticas, ambientais e sociais, caracterizando-a como um grave problema de saúde pública. A doença possui ampla distribuição geográfica e no ano de 2018 foram notificados mais de 46 mil casos novos nas Américas, sendo mais de 16 mil só no Brasil (PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019).

A LT possui alta morbidade, e na América Latina, a cura espontânea ocorre somente em 6% dos pacientes acometidos com a forma cutânea localizada causada pela espécie *Leishmania braziliensis*, o que acarreta para os pacientes extensos períodos com a lesão (COTA et al., 2016). Além de alta morbidade, a doença vem causando mortalidade, sendo essa condição não esperada, pois é uma doença com tratamento eficaz, apesar das drogas possuírem características tóxicas (GONZÁLEZ et al., 2009; ROMERO et al., 2017).

Atualmente, o diagnóstico da doença realizado no país é baseado em critérios clínico-epidemiológicos e exames laboratoriais essencialmente parasitológicos, o que é um desafio, devido à variação da sensibilidade dos testes de acordo com as formas clínicas. Com o advento dos métodos moleculares abriram-se perspectivas para diagnósticos mais acurados e passíveis de resultados não só qualitativos, como quantitativos. Entretanto, apesar de serem técnicas amplamente utilizadas em laboratórios de pesquisa, ainda se restringem a grandes centros, devido à necessidade de laboratórios equipados com materiais e insumos de custo elevado (GOTO & LINDOSO, 2010).

Além do problema relacionado à acurácia dos testes disponíveis, outra dificuldade se refere à coleta das amostras, que é realizada de modo invasivo, através de escarificação ou biópsia da lesão, sendo essa, permitida ser realizada apenas por profissionais médicos (GOTO & LINDOSO, 2010). Portanto, alternativas menos invasivas são necessárias, tendo em vista minimizar o desconforto dos pacientes e possibilitar a execução da coleta por outros profissionais da saúde em centros de saúde de menor infraestrutura. A utilização do *swab* para coleta das amostras

associada ao diagnóstico molecular vem sendo relatada com sucesso, mas ainda são imprescindíveis novos estudos de avaliação do desempenho desse método de coleta associados às técnicas diagnósticas na prática clínica (ADAMS et al., 2014; BONI et al., 2017; GOMES et al., 2017; SEVILHA-SANTOS et al., 2019).

Os métodos moleculares trazem novas perspectivas para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias, mas exigem material genético de alta qualidade para a realização, visto que a integridade e a pureza do DNA estão diretamente ligadas ao desempenho dessas técnicas. São escassos na literatura estudos que avaliam métodos de extração e a qualidade do DNA, principalmente associados a métodos de coleta minimamente invasivos, como as amostras colhidas por *swab*. A literatura também é limitada no que se refere a estudos que abrangem o diagnóstico da LT, principalmente da forma mucosa. Além disso, a maioria dos estudos publicados até o presente se baseia em ensaios experimentais ou possuem baixo poder estatístico, o que afeta a reprodutibilidade do estudo.

Considerando as limitações do diagnóstico laboratorial disponível atualmente para LT, o estabelecimento de um método molecular de elevado desempenho, que considere durante a sua padronização diferentes métodos de extração e análise da qualidade das amostras, é essencial para compor o arsenal diagnóstico da doença. Além disso, o uso de métodos de coleta minimamente invasivos resulta em aumento de acesso, descentralização do atendimento e maior conforto para os pacientes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aspectos gerais

A LT é uma doença infecciosa, não contagiosa, que acomete pele e mucosas e ocupa lugar de destaque entre as doenças dermatológicas, devido a sua magnitude e morbidade associada (BERN, MAGUIRE & ALVAR, 2008; MATHERS, EZZATI & LOPEZ, 2007). Esta doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903, ordem Kinetoplastida (HONIGBERG, 1963, emend. VICKERMAN, 1976) e família Tripanossomatidae (DOFLEIN, 1901 emend. GROBBEN, 1905).

Esses protozoários possuem ciclo de vida heteroxênico, envolvendo reservatório vertebrado e vetor artrópode. De acordo com o hospedeiro, estes parasitos se apresentam através de duas formas principais: amastigota intracelular obrigatória do sistema mononuclear fagocitário de hospedeiros vertebrados e promastigota flagelada presente no tubo digestivo do inseto vetor (PAHO/WHO, 2019; RANGEL & LAINSON, 2003).

A doença é transmitida através da picada do vetor infectado (fêmea de flebotomíneo) no momento do repasto sanguíneo (BRASIL, 2017; RANGEL & LAINSON, 2003). Os insetos transmissores pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae e à subfamília Phlebotominae. No Brasil, as principais espécies de flebotomíneos envolvidos na transmissão de *Leishmania* dermatrópicas são: *Nyssomyia intermedia*, *Ny. neivai*, *Ny whitmani*, *Ny. umbratilis*, *Migonemyia migonei* e *Bichromomyia flaviscutellata* (BRASIL, RODRIGUES & ANDRADE-FILHO, 2015; RANGEL & LAINSON, 2003)

No Brasil, as principais espécies de *Leishmania* envolvidas na etiologia da LT humana pertencem aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, sendo elas: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Outras espécies menos prevalentes são *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) naiffi* (LAINSON et al., 1979; LAINSON & SHAW, 1989). Entre estas espécies, *L. braziliensis* é a que apresenta maior relevância epidemiológica, devido à alta prevalência e espectro clínico variável, podendo causar a forma cutânea e mucosa da doença (BRASIL,

2017). Recentemente, tem sido relatados casos de *L. (L.) infantum*, espécie mais conhecida por seu tropismo visceral, causando também a forma tegumentar da leishmaniose (LYRA et al., 2015).

A LT pode se apresentar através de diferentes manifestações clínicas, que serão influenciadas pela espécie de *Leishmania* causadora da infecção e pelo estado imunológico do indivíduo acometido (KEVRIC, CAPPEL & KEELING, 2015; MARZOCHI, 1992). Classicamente, é dividida em duas formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), que é a mais frequente e a leishmaniose mucosa (LM), considerada a mais severa. A LC, de acordo com as diferentes apresentações clínicas, ainda se subdivide em: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose cutânea disseminada (LD) e leishmaniose cutânea recidivante (LCR) (GOTO & LINDOSO, 2012).

A LT é endêmica em mais de 87 países, sendo registrada em toda a África, Ásia e sul da Europa (WHO, 2017). Nas Américas, há casos notificados do extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, exceto no Uruguai e no Chile (PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019). Novos focos da doença estão surgindo, provavelmente, devido a mudanças ecológicas no habitat do vetor, como: desmatamentos, mudanças climáticas e urbanização (ALVAR et al., 2012; BRANDÃO-FILHO et al., 1999; DESJEUX, 2004).

Atualmente, o Brasil apresenta três padrões epidemiológicos definidos. Sendo eles: 1) Silvestre: ocorre em área de vegetação primária acometendo animais silvestres e o homem, quando entra em contato com esse ambiente; 2) Ocupacional e lazer: está associado à exploração da floresta para construção civil, atividades agropecuárias e ecoturismo; e 3) Rural e periurbano em áreas de colonização: relacionado ao processo migratório e a centros urbanos próximos às matas residuais (BRASIL, 2017; MARZOCHI, 1992).

Entre 2001 e 2018, 989.096 novos casos de LT foram relatados nas Américas, com média anual de 54.950 novos casos e taxa de incidência de 18,91 casos por 100.000 habitantes (PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019). No Brasil, no período de dez anos (2008 a 2018) foram confirmados 230.794 casos de

LT (BRASIL, 2019a). Devido ao amplo espectro de gravidade dos sinais e sintomas, à elevada incidência da doença e a toxicidade do tratamento hoje disponível, a LT é uma doença que merece destaque no âmbito da pesquisa e da saúde pública no país.

O tratamento da LT, definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e adotado pelo Ministério da Saúde do Brasil (MS) como primeira linha, consiste na administração de antimoniato de meglumina (intravenoso ou intramuscular), na dose de 20 mg/Kg/dia (BRASIL, 2017; WHO, 2010). Opções secundárias a este tratamento incluem a anfotericina B e a pentamidina, também de administração intravenosa e com reações adversas graves (LIMA et al., 2010). Recentemente, no Brasil, um estudo clínico avaliou a eficácia da miltefosina no tratamento da LM e encontrou uma probabilidade de cura 2,08 vezes maior do que em pacientes tratados com antimoniato de meglumina, sugerindo que esta pode ser uma alternativa, especialmente devido à sua administração oral (SAMPAIO et al., 2019). Diversos estudos já descreveram a toxicidade do antimoniato de meglumina, e mais recentemente o tratamento na dose recomendada mostrou associação com a letalidade de pacientes com LT (SOUZA, 2018).

O diagnóstico precoce da LT permanece como desafio para o Programa de Controle e Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana do Ministério da Saúde, cujo objetivo consiste na redução da morbidade e dos óbitos associados à doença. (DINIZ, COSTA & GONÇALVES, 2011). A confirmação de um caso suspeito de LT pode ser realizada apenas baseando-se em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Dos casos de LT notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) no Brasil, entre 2008 e 2018, aproximadamente 21% dos pacientes teve o diagnóstico confirmado segundo critério clínico-epidemiológico (BRASIL, 2019a). Esse alto percentual pode refletir a falta de acesso ao diagnóstico laboratorial adequado, principalmente nas regiões rurais, onde há baixa infraestrutura e alta prevalência da doença (BRASIL, 2017). A elevada toxicidade do tratamento e a gama de doenças infecciosas que apresentam similares manifestações clínicas e aspectos epidemiológicos, tornam necessário e seguro a associação de tais métodos para o diagnóstico preciso. Além disso, a ausência de um teste diagnóstico “padrão-ouro” e a dificuldade de acesso aos Centros de

Referências atrasam o início do tratamento, o que pode causar danos maiores e irreversíveis ao paciente.

3.2 Diagnóstico clínico e imunopatogênese

3.2.1 Diagnóstico clínico e imunopatogênese da LC

No Brasil, no período de dez anos (2008 a 2018) foram notificados um total de 216.777 casos de LC. Sendo que no ano de 2018 foram reportados mais de 16 mil casos e desses, 3.266 foram confirmados apenas por critério clínico-epidemiológico (BRASIL, 2019a).

Embora o diagnóstico clínico-epidemiológico seja um importante aliado na suspeita de casos de LT, um dos desafios dessa prática são condições e doenças com manifestações similares e co-endêmicas. Além disso, essas outras infecções podem ocorrer de forma concomitante com a LT. O diagnóstico diferencial de LC inclui esporotricose, miíase, tuberculose cutânea, furúnculo, picada de insetos, dentre outros (HANDLER et al., 2015).

Considerada a apresentação clínica mais comum e branda da doença, a LCL caracteriza-se por apresentar lesões únicas ou múltiplas, com fundo granulomatoso e bordas elevadas. As lesões geralmente ocorrem em forma de úlcera e em áreas expostas da pele, onde, provavelmente ocorreu a picada do vetor infectado (MARZOCHI, 1992). COTA et al. (2016) relataram apenas 6% de cura espontânea da LCL causada por *L. braziliensis*.

A LCD se manifesta através do aparecimento de lesões do tipo pápulas, placas ou tubérculos, em geral, não ulceradas que se disseminam de forma lenta por grandes extensões cutâneas (COSTA et al., 2009; GOTO & LINDOSO, 2012). No Brasil é causada por *L. amazonensis*, mas também pode ser causada por *L. mexicana* e *L. aethiopica*, no Novo e Velho Mundo, respectivamente. Nessa forma clínica há uma exacerbada proliferação dos parasitos nas lesões, devido à fraca resposta das células T ao antígeno de *Leishmania* (CONVIT, PINARDI & RONDÓN, 1972).

No Brasil a LD ocorre, em apenas 2% dos casos de LT e está associada à *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, sendo a última, espécie responsável pela maioria dos casos (CONVIT, KERDEL-VEGAS & GORDON, 1962; TURETZ et al., 2002). Essa forma clínica é grave e tem como início da manifestação o aparecimento de lesão cutânea ulcerada. Entretanto, em pouco tempo, se dissemina por via linfática ou sanguínea, surgindo assim múltiplas lesões (dez ou mais) do tipo papulares e acneiformes por duas ou mais áreas não contínuas do corpo. O acometimento mucoso nos pacientes com LD ocorre em aproximadamente 25% dos casos (CARVALHO et al., 1994; MACHADO et al., 2011).

Mais prevalente no velho mundo, a LCR também já foi observada no novo mundo e está associada às espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* no Brasil e *L. panamensis* no Equador. Essa forma clínica caracteriza-se pelo aparecimento de uma lesão ativa na borda ou próxima da lesão cicatrizada, que se desenvolve após período variável de tempo e com ou sem tratamento anterior (GOTO & LINDOSO, 2012).

O processo de imunopatogênese está relacionado às diferentes manifestações clínicas da LC. Na imunopatogênese da LCL (quadro 1) as células T CD4, em presença de antígenos da *Leishmania* são ativadas e produzem interferon- γ (IFN- γ) e IL-2, que caracterizam a resposta do tipo Th1. A secreção de IFN γ exerce forte ativação sobre macrófagos infectados, que por sua vez produzem IL-1 e fator de necrose tumoral-inflamatória- α (TNF α). A tentativa exacerbada de contenção da inflamação resulta na destruição tecidual no local infectado, formando a úlcera dérmica. Os macrófagos além de secretarem TNF α que contribui para a lise tecidual produzem também fatores angiogênicos capazes de induzir a formação de novos vasos, que sustentam a inflamação permitindo que um maior número de células se direcionem ao local da lesão (BACELLAR et al., 2002; CARVALHO, PASSOS & JESUS, 2005; KUMAR et al., 2007). Ademais, os macrófagos são capazes de produzir citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF β . Essas citocinas são capazes de contra regular as citocinas pró-inflamatórias, diminuindo em parte a exacerbada resposta inflamatória.

3.2.2 Diagnóstico clínico e imunopatogênese da LM

O Brasil, entre 2008 e 2018, notificou mais de 13 mil casos de LM, sendo que desses, aproximadamente três mil (23%) tiveram o diagnóstico baseado em critérios clínico-epidemiológicos (BRASIL, 2019a). No país, o maior número de casos de LM é notificado nas regiões norte (40%) e centro-oeste (21%) (BRASIL, 2019a), sendo causada mais frequentemente por *L. braziliensis*, mas casos da forma mucosa causada por *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, também vêm sendo descritos no país (BARRAL et al., 1991, 1996; GUERRA et al., 2011; NAIFF, TALHARI & BARRETT, 1988).

Clinicamente, a LM caracteriza-se por apresentar lesões destrutivas e progressivas, localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores. Estas lesões podem ocorrer simultaneamente com a manifestação cutânea (leishmaniose mucocutânea), seja de forma adjacente (forma contígua) ou à distância (forma concomitante). Mas podem ocorrer também de forma isolada, ou ainda de forma tardia, meses ou anos após o aparecimento da LC. Em contraste com a LC, a LM pode conduzir a quadros clínicos desfigurantes e é potencialmente fatal. O que torna imprescindível o diagnóstico oportuno e tratamento precoce (GOTO & LINDOSO, 2012; SOUZA, 2018).

Dentre as diversas manifestações e sinais clínicos da LM, os mais comuns ocorrem na mucosa nasal, sendo, enantema, infiltração, erosão, ulceração e conseqüentemente, perfuração do septo nasal. Essas manifestações variam de acordo com o tempo de evolução clínica e podem causar sintomas como: prurido, obstrução nasal e dor, sendo esse, normalmente associado a infecções secundárias, bacterianas e/ou fúngicas (BRASIL, 2019b).

A doença acomete também a cavidade oral (faringe, laringe, palatos mole e duro, lábios e língua), o que pode causar diversos outros sintomas, como a disfonia, odinofagia, disfagia, rouquidão, dispneia, tosse e dificuldade na deglutição e na fala, necessitando inclusive de reabilitação (RUAS et al., 2014). E mais raramente, afeta outras mucosas como a região genital e conjuntiva ocular (BRASIL, 2017).

O diagnóstico diferencial de LM inclui paracoccidioidomicose, carcinoma epidermoide, carcinoma basocelular, linfomas, rinofima, rinosporidiose, entomoftoromicose, hanseníase virchowiana, sífilis terciária, perfuração septal traumática ou por uso de drogas, rinite alérgica, sinusite, sarcoidose, granulomatose de Wegener, dentre outras doenças.

Os fatores associados à ocorrência da LM não estão completamente elucidados na literatura. Tratamento inadequado ou inexistente e condições do sistema imune do indivíduo são frequentemente relacionados à ocorrência do acometimento mucoso. MACHADO-COELHO et al. (2005) também identificaram a idade, sexo, peso, extensão e duração da doença, como fatores associados. Correlação positiva entre a gravidade da LM, a idade e o período de tempo entre lesão cutânea, também foram verificadas por CINCURÁ et al. (2017). Além desses fatores, pequenas diferenças encontradas no genoma da *L. braziliensis* em relação a outras espécies podem contribuir no tropismo metastático e no aumento da virulência dessa espécie causadora de LM (ALVES-FERREIRA et al., 2015; ASHFORD, 2000; VON STEBUT, 2015).

Condições relacionadas às coinfeções também são relatadas com possível influência no curso clínico da LM (AKUFFO et al., 2018; AZEREDO-COUTINHO et al., 2016; GARCÍA BUSTOS et al., 2016). Segundo Martínez et al. (2018), os casos de coinfeção são frequentes e podem levar a erros e atrasos no diagnóstico, além de influenciar na eficácia e segurança do tratamento. A coinfeção de *Leishmania* com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), causando a forma mucosa, vem sendo descrita no Brasil desde a década de 90, com ocorrência de manifestações típicas e atípicas (DA-CRUZ et al., 1999; LINDOSO et al., 2009; MACHADO et al., 1992). Lindoso et al. (2009) verificaram predomínio de lesões atípicas em pacientes com esta coinfeção, como, por exemplo, ocorrência de infiltração difusa na superfície mucosa do palato e ferida na região central. No Brasil, em 2018 foram registrados 168 casos de coinfeção LC/LM e HIV (PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019). A coinfeção de *Leishmania* com parasitos intestinais foi avaliada por Azeredo-coutinho et al. (2016) em um estudo de coorte retrospectivo. De acordo com os autores, os pacientes coinfectados por tais parasitos levaram significativamente mais tempo até a cura das lesões e tiveram

maior frequência de falha terapêutica e recidiva. Além disso, evidenciaram associação da forma mucosa com infecções intestinais causadas por nematoides, especialmente *Ascaris lumbricoides*.

No final dos anos 80 foram descobertos vírus da família *Totiviridae* em diferentes espécies de *Leishmania* (GUILBRIDE, MYLER & STUART, 1992; TARR et al., 1988; WIDMER et al., 1989) O vírus (LRV1) de *L. guyanensis* foi o primeiro vírus de cinetoplastídeos totalmente caracterizado em termos moleculares e está sendo relacionado à patogênese dos parasitos (GRYBCHUK et al., 2018). Diversos estudos vêm sendo realizados a fim de se compreender a associação da presença do vírus com o acometimento mucoso (HARTLEY et al., 2012; IVES et al., 2011; SCOTT, 2011). Cantanhêde et al. (2015) demonstraram correlação entre a infecção por LRV1 e o risco relativo de o indivíduo desenvolver lesão na mucosa (2.93 vezes maior). Em estudo realizado com amostras de pacientes infectados por *L. braziliensis* no Peru e Bolívia os autores encontraram associação significativa com a presença do vírus LRV1 e o aumento do risco na falha do tratamento (odds ratio, 3,99; $p = 0,04$) (ADAUI et al., 2016). Entretanto, outras pesquisas demonstram baixa frequência e associação à infecção pelo vírus e a gravidade da doença (MACEDO et al., 2016; PEREIRA et al., 2013).

A imunopatogênese da LM é caracterizada por apresentar uma resposta imune celular exacerbada do tipo Th1, com altos níveis de citocinas pró-inflamatória, como TNF- α , IFN- γ e baixos níveis de expressão de IL-10, TGF- β e da síntese de óxido nítrico. Esse processo inflamatório é marcado por vigorosa reação cutânea de hipersensibilidade do tipo tardia (FARIA et al., 2005; SILVEIRA, 2019). Este tipo de resposta imune desencadeada na infecção, pode ser a causa das manifestações e sinais clínicos e do baixo número de parasitos presentes na lesão (SCOTT, 2011). O Quadro 1 resume algumas características clínicas, histopatológicas e imunológicas de LT no Brasil.

Quadro 1 Características patogênicas da leishmaniose tegumentar no Brasil.

Característica da doença	LCL	LM
Espécie	<i>L. amazonensis</i> / <i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
Carga parasitária	+++ / ++	+
Tipo de lesão	Ulcerada	Ulcerada
Distribuição da lesão	Única/múltiplas	Nasofaringe
Macrófagos	+++ / ++	-
Células plasmáticas	+++ / ++	++
Linfócitos	++ / +++	++++
Necrose	- / +++	++++
Granuloma	Macrofágico / Epitelióide	Tuberculóide
DTH*	+ / +++	++++
Linfoproliferação	+ / ++	++++
IFN- γ	++ / +++	++++
IL-4	++ / +	-
CD4 Th1/Th2	Th1 > Th2	Th1 > Th2
Tratamento com antimonial pentavalente	+ / +	+

*DTH: hipersensibilidade imunológica.

Fonte: Adaptado de SILVEIRA, 2019.

3.3 Diagnóstico laboratorial

3.3.1 Avaliação do paciente e obtenção de material biológico

A avaliação do paciente deve ser realizada por médico especialista. Na forma cutânea as especialidades podem ser infectologistas e dermatologistas. Já para a forma mucosa o otorrinolaringologista é o profissional indicado e capacitado para essa função, que consiste na realização de exames como a rinoscopia, orofaringoscopia e laringoscopia. Além disso, em todos os atendimentos deve ser realizada anamnese completa do paciente e avaliação da necessidade da realização de escarificação, punção aspirativa ou biópsia. Essas técnicas são invasivas, sendo que a biópsia pode ser realizada apenas por profissional médico, por se tratar de um procedimento cirúrgico.

O procedimento de escarificação envolve a confecção de esfregaço em lâmina, devendo ser utilizados lâmina de bisturi ou estilete para a coleta de linfa na borda

interna da úlcera ou da superfície da lesão fechada. Para a realização da escarificação e retirada de fragmentos por biópsia, é primeiramente realizada a limpeza do local da lesão e retirada de crostas. Para a biópsia, após a antissepsia da lesão é realizada anestesia local com lidocaína 1% ou 2%. Para a retirada dos fragmentos da lesão cutânea é utilizado um *punch* de 4 mm a 8 mm de diâmetro. E na forma mucosa é utilizada a pinça para biópsia, também conhecida como “sacabocado”. O aspirado da lesão é puncionado após aplicação de soro fisiológico na borda da lesão ou linfonodo (BRASIL, 2017).

Os métodos invasivos, além de causarem desconforto e eminente risco ao paciente, são de difícil realização em populações pediátricas, em locais remotos com pouca infraestrutura e na ausência de profissionais capacitados. Considerando as limitações dos testes diagnósticos disponíveis para LT e outros agravos, a OMS estabeleceu um conjunto de critérios para o desenvolvimento de um bom teste diagnóstico, o acrônimo ASSURED (MABEY et al., 2004). Land et al. (2019), sugeriram uma atualização desses critérios com a inclusão de dois novos parâmetros de referência (REASSURED), sendo que um deles indica “Facilidade na coleta das amostras, de forma não invasiva”.

Como alternativa ao panorama atual, vem sendo estudados alguns métodos para coleta de material de forma não invasiva. Dentre eles, testes utilizando escova citológica cervical, fita adesiva em formato de disco, papel filtro e *swab* (BOGGILD et al., 2010; TASLIMI et al., 2017). Esses métodos, além da vantagem de fácil execução, podendo ser realizados por outros profissionais da saúde, são melhor tolerados pelos pacientes e ainda contribuem para a diminuição de custos no diagnóstico. Estudos sobre a utilização desses métodos serão apresentados nas seções seguintes, relacionados às diferentes técnicas diagnósticas.

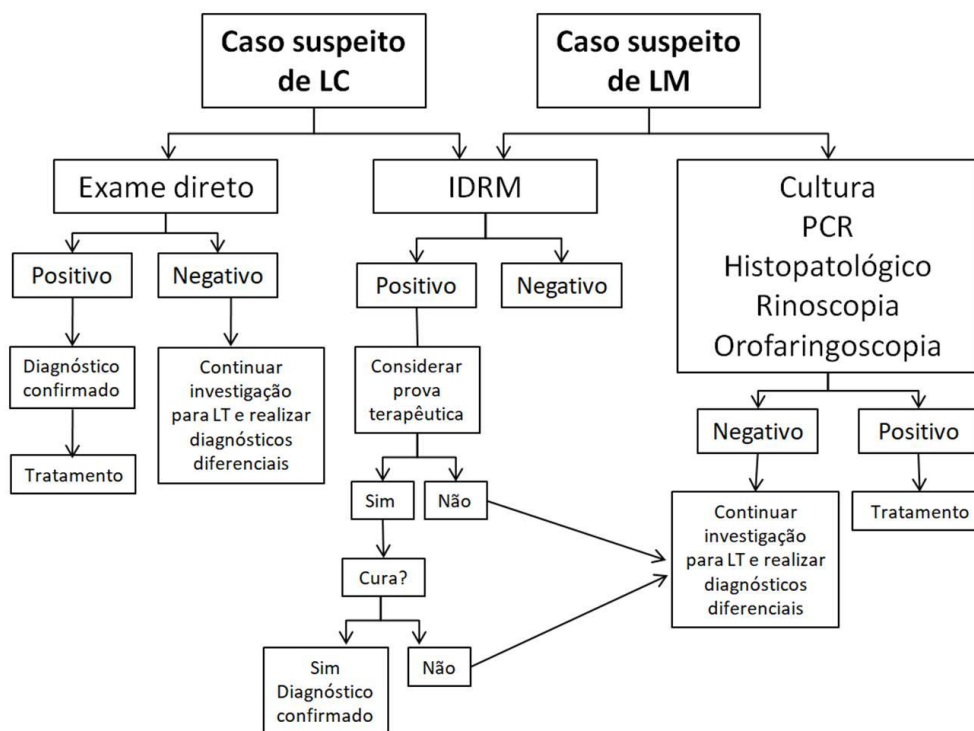
Sevilha-Santos et al. (2019), avaliaram em pesquisa recente no Brasil, qual a profundidade ideal para coleta das amostras de LT para subseqüentes testes moleculares (n=59). Os pesquisadores analisaram diferentes camadas da pele, incluído a epiderme, derme superior e inferior e hipoderme. A melhor acurácia diagnóstica foi na derme superior (77,9%) e foi significativamente maior que na

hipoderme (63,3%; $p= 0,039$). Com isso, concluíram que a amostra coletada na camada mais superficial pode recuperar um maior número de parasitos.

3.3.2 Métodos diagnósticos

Em 2017, o MS publicou o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar, onde constam fluxogramas com os testes (imunológicos, histopatológicos e parasitológicos) preconizados para a realização do diagnóstico laboratorial em caso de suspeita de LT (Figura 1).

Figura 1 Fluxograma do diagnóstico das formas cutânea e mucosa da leishmaniose tegumentar.



Fonte: Adaptado de BRASIL, 2017.

3.3.2.1 Métodos imunológicos

O teste imunológico indicado no manual do MS (2017) é a Intradermorreação de Montenegro (IDRM), que consiste em um teste baseado na resposta de hipersensibilidade tardia do paciente. O procedimento envolve a inoculação

intradérmica de 0,1 mL do antígeno total de *Leishmania* spp, preparado a partir de extrato de promastigotas, na face anterior do antebraço do paciente (MONTENEGRO, 1926; SHAW & LAINSON, 1975). A leitura do resultado deve ser realizada após 48 a 72 h da aplicação, e o teste é considerado positivo quando ocorre induração igual ou maior que cinco mm de diâmetro. IDRМ apresenta alto valor preditivo, sendo positivo em mais de 90% dos casos de LT (GOTO & LINDOSO, 2010). Mas, dentre as limitações do teste, está a baixa especificidade e a não diferenciação de doença como atual ou pregressa e, portanto, o resultado deve ser interpretado em conjunto com os demais sinais apresentados (REITHINGER et al., 2007; WEIGLE et al., 2002).

Entretanto, é importante ressaltar que atualmente o teste não está disponível no Brasil. No ano de 2016 ocorreu a interrupção da produção do antígeno pelo CPPI - Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, localizado no Estado do Paraná, sul do Brasil, e único produtor no país. A interrupção deveu-se a exigências de adequação das dependências da área de produção pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRAZ, 2019).

Os testes sorológicos baseados na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) são recomendados pela OMS (WHO, 2010). Atualmente, no Brasil, a IFI Leishmaniose Humana, produzida por BioManguinhos (Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ), é o único teste disponível na rede pública, e apresenta desempenho variável (65 a 75,4% de sensibilidade e 70 a 89% de especificidade) (OLIVEIRA, 2018). Esse teste é indicado para o diagnóstico complementar da LM, pois pacientes acometidos por essa forma, em geral, apresentam níveis mensuráveis de anticorpos circulantes, ao contrário do que acontece na forma cutânea da LT.

Ensaio imunoenzimáticos de ELISA vêm sendo amplamente empregados para avaliação de antígenos purificados ou recombinantes, visando a melhoria do desempenho dos testes sorológicos e a eliminação das reações cruzadas com outros agentes infecciosos (CERVANTES-LANDÍN et al., 2014). Coelho et al. (2016) avaliaram no mesmo estudo as proteínas Citocromo c oxidase VII (CcOx) e HRF (Fator liberador de histamina dependente de IgE) em ensaio imunoenzimático de

ELISA em um grupo de 24 pacientes com suspeita de LT e 20 controles saudáveis. Os pesquisadores utilizaram como critério de confirmação da doença, exame clínico, exame direto e reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram reportadas sensibilidade e especificidade de 100%.

Disponível comercialmente em outros países, o *CL Detect Rapid Test* (InBios International Inc., Seattle, WA, EUA) é um teste diagnóstico baseado em imunocromatografia de fluxo lateral e utiliza anticorpo anti-peroxidoxina na detecção desse antígeno em amostras de lesões cutâneas. De acordo com o fabricante essas lesões devem estar ulceradas e não devem ter mais de quatro meses de evolução. As amostras para realização do teste podem ser coletadas através de biópsia ou escova citológica (INBIOS INTERNATIONAL, 2020). Recentemente, no Suriname, foi realizado um estudo de avaliação do teste, onde a espécie prevalente no país também circula no Brasil, a *L. guyanensis*. Os pesquisadores encontraram baixa sensibilidade (35,8%) e especificidade de 83%, quando comparado à técnica de PCR (SCHALLIG et al., 2019).

3.3.2.2 Métodos histopatológicos

Dentre os testes indicados no manual estão ainda os exames histopatológicos, que consistem na análise microscópica do fragmento de biópsia, no qual são avaliadas alterações morfológicas no tecido. As características morfológicas encontradas na histopatologia são amplamente variadas, mas padrões sugestivos da infecção por *Leishmania* incluem reação exsudativa celular, granulomatosa, necrótica e tuberculóide (MAGALHÃES et al., 1986). Embora a análise histológica possa contribuir com o diagnóstico da LT, o resultado somente pode ser considerado positivo quando formas compatíveis com amastigotas são observadas no tecido analisado. Caso contrário, o resultado será liberado como inconclusivo ou sugestivo de alguma patologia granulomatosa.

Devido à baixa sensibilidade dessa técnica para o diagnóstico da LT, outro método vem sendo estudado para contribuir e complementar ao diagnóstico histopatológico (MAGALHÃES et al., 1986). A técnica de imuno-histoquímica é baseada na

detecção do parasito ou antígeno em cortes histológicos por meio de ligações com anticorpos específicos. Com o objetivo de comparar métodos moleculares e imunohistoquímicos no diagnóstico da LC, Shirian et al. (2014) avaliaram os testes utilizando 100 amostras de lesões típicas e atípicas com suspeita clínica da doença. Os pesquisadores reportaram maior sensibilidade no teste cPCR-kDNA (lesões típicas 100% e lesões atípicas 94%) e 100% de especificidade em ambos tipos de lesões. O segundo melhor desempenho encontrado foi do teste de imunohistoquímica (sensibilidade de 97% nas lesões típicas e 94% nas atípicas) e também 100% de especificidade.

3.3.2.3 Métodos parasitológicos

Os métodos classificados como parasitológicos podem ser divididos em métodos diretos, onde ocorre a visualização do parasito e os indiretos, onde há nos exames demonstração dos produtos desses parasitos.

Na forma cutânea, para pesquisa direta do parasito realiza-se a aposição do fragmento da lesão (obtido por biópsia) em lâminas (*imprint*), e o exame é baseado na visualização em microscópio do parasito, na forma amastigota, em lâminas coradas com Giemsa. Estudo demonstra que a sensibilidade dessa técnica varia entre 70 a 75% (DE MELLO et al., 2011).

Além dos testes realizados com a utilização de amostras obtidas por forma invasiva, um método de coleta minimamente invasivo foi avaliado em estudo realizado no Irã. Os pesquisadores utilizaram amostras sabidamente positivas e compararam dois métodos de obtenção de amostra, um invasivo (fragmento de biópsia para cultura) e outro não invasivo (material obtido através de fixação de fita adesiva em formato de disco na lesão). Ambos os métodos foram comparados através do teste diagnóstico de microscopia. A maior sensibilidade diagnóstica, 100% (IC 95%) foi obtida com a técnica da fita adesiva. A cultura de biópsia detectou apenas 16 dos 31 pacientes, apresentando 51% de sensibilidade, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (TASLIMI et al., 2017).

Outra forma de visualização do parasito é através do cultivo *in vitro*, que consiste em inocular os fragmentos de biópsia ou aspirado da lesão em meio bifásico, sendo *Novy-MacNeal-Nicolle* (NNN) associado à *Liver Infusion Tryptose* (LIT) ou solução salina, e incubar em temperatura aproximada de 25 °C. Essa cultura é então avaliada ao microscópio semanalmente, a fim de verificar a existência de formas promastigotas viáveis (BRASIL, 2017). Dentre as limitações deste método, a principal delas é a baixa sensibilidade encontrada, principalmente para a forma mucosa, o que pode ser justificado pela escassez de parasitos presentes na lesão, devido à exacerbada reação inflamatória do hospedeiro. Além disso, a técnica é bastante susceptível a contaminações por bactérias e fungos e a liberação do resultado é demorada, podendo chegar a 30 dias (VEGA-LÓPEZ, 2003).

Por ser objeto de estudo deste trabalho, os métodos moleculares apesar de serem classificados como parasitológicos serão descritos em seção destacada.

3.3.2.4 Métodos moleculares

Os métodos moleculares vêm sendo cada vez mais utilizados para o diagnóstico de doenças infecciosas e identificação de patógenos. Esses métodos consistem na amplificação *in vitro* de sequências de DNA ou RNA alvo através da utilização de iniciadores de regiões específicas. Cada alvo tem uma característica particular, podendo ter sequencias variáveis ou conservadas entre as espécies de *Leishmania* (CONTER et al., 2019). Portanto, a escolha correta do alvo para o desenho dos iniciadores influencia diretamente no desempenho da técnica.

Entre as diversas regiões gênicas de *Leishmania* amplamente estudadas estão às regiões ITS (*Internal transcribed spacer*), citocromo B, genes de Miniexón (SL-RNA), entre outras. As regiões classificadas como altamente conservadas, e, portanto bastante utilizadas na projeção de iniciadores são as regiões Gp63, conhecida como leishmanolisina e principal protease de superfície da *Leishmania* (YAO, DONELSON & WILSON, 2003), genes do RNA ribossomal (*Small subunit ribosomal*- SSU rRNA) (VAN EYS et al., 1992), rRNA 18S (ADAMS et al., 2010; SRIWORARAT et al., 2015) e principalmente diferentes regiões do minicírculo do cinetoplasto (kDNA), que é

uma estrutura conservada nos tripanosomatídeos e que tem apresentado elevada sensibilidade nos testes moleculares (> que 94%) (BORST & HOEIJMAKERS, 1979; DE PAIVA CAVALCANTI et al., 2013; ROMERO et al., 2001). Além disso, genes codificadores das proteínas de choque térmico como hsp70 têm sido largamente utilizados para estudos filogenéticos e taxonômicos de *Leishmania* (GONÇALVES, 2018; MONTALVO et al., 2017; PEREIRA et al., 2017; WEIRATHER et al., 2011).

Dito isso, testes baseados na amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) podem contribuir efetivamente no diagnóstico da LT e na genotipagem das espécies causadoras da doença.

a) Métodos de extração e qualidade do material genômico

O isolamento dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) é pré-requisito para amplificação por técnicas moleculares e uso subsequente. O primeiro relato de isolamento de DNA foi em 1869 na Suíça. O médico e professor Friedrich Miescher realizou a extração a partir de leucócitos presentes em secreção de ataduras cirúrgicas, com o objetivo de determinar a composição química das células (DAHM, 2005).

Nas últimas décadas, com o advento das técnicas moleculares em diferentes áreas, como na saúde, perícia forense, agronomia, entre outras, emergiram também diversos métodos de extração de DNA. A extração pode ser realizada a partir de fluidos corporais ou amostras clínicas (sangue, urina, fragmentos de tecido) ou de materiais os quais foram utilizados diretamente na coleta das amostras, como exemplo, o *swab*. Em geral, extrações produtivas são realizadas em locais livres de contaminantes, e em duas principais etapas: 1) ruptura eficiente de tecidos ou células; e 2) purificação do DNA obtido (TAN & YIAP, 2009).

São descritos na literatura e nas páginas eletrônicas de diversas empresas, diferentes protocolos para extração de DNA, desde técnicas mais simples e de baixo custo, até kits e equipamentos de alta tecnologia. A escolha do método de extração ideal depende de fatores como: tipo de amostra, tempo e recurso disponíveis, grau

de pureza e rendimento esperados, e para qual finalidade será utilizado o produto extraído.

Dentre os métodos convencionais de extração estão os métodos manuais que podem ser realizados através da *lise* das células/tecidos por ruptura mecânica e extração com solventes, como fenol e clorofórmio. A técnica *salting-out* baseia-se na utilização de sais orgânicos em altas concentrações, como o perclorato de sódio que precipita as moléculas orgânicas, e após centrifugação e adição de álcool é possível extrair o DNA da solução aquosa (JOHN et al., 1991; LAHIRI & NUMBERGER, 1991). Outra forma ainda mais simples, de baixo custo e rápida de extração é a partir da submissão do material bruto à elevadas temperaturas (~100 °C) acrescidos ou não de detergentes, como o triton-x (MIKITA et al., 2014; SRIWORARAT et al., 2015).

Disponíveis comercialmente estão os kits baseados na utilização de Proteinase K, que é uma enzima que possui boa ação desnaturante, realizando a digestão de proteínas; associada à coluna com membrana de sílica, que retém e concentra o DNA. Esses kits são amplamente utilizados em laboratórios de médio porte (WOODARD; HOWARD & DOWN, 1993). Além deles, também são comercializados *beads* magnéticas, que consistem em partículas com carga magnética com afinidade por ácidos nucleicos (BERENSMEIER, 2006). Ainda mais tecnológico, atualmente estão disponíveis equipamentos automatizados para extração. Entretanto, a automação do processo é cara, complexa e, por isso, utilizada apenas por laboratórios de grande porte (TAN & YIAP, 2009).

A inclusão de novas tecnologias moleculares e o aumento da demanda trouxe a necessidade de equilibrar tempo e custo da extração sem comprometer a qualidade e integridade do DNA extraído (SCHIEBELHUT et al., 2017). A concentração, pureza e integridade do DNA estão diretamente ligadas ao desempenho dos testes posteriormente realizados com a utilização do material genômico.

Para avaliação da qualidade do DNA são realizados alguns métodos. A quantificação e pureza podem ser avaliadas com a utilização de aparelho espectrofotômetro, que através da mensuração da quantidade de luz absorvida

(absorbância) é capaz de calcular a concentração em nanogramas (ng) no comprimento de onda de 260 nanômetros (nm). Além disso, através da espectrofotometria é possível realizar análise de pureza do DNA utilizando o cálculo 260 nm/280nm. Pois, mesmo nos métodos de extração contendo etapa de purificação é possível e comum que as amostras de ácido nucleico estejam contaminadas por outras moléculas como proteínas, compostos orgânicos, polissacarídeos e fenóis (RIEMANN et al., 2007; SANTELLA, 2006).

A integridade do DNA pode ser avaliada através de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. A análise das bandas no gel, que correspondem ao DNA, permitem essa avaliação. Amostras com DNA íntegro apresentam-se na forma de bandas únicas e altas. Já nas amostras degradadas as bandas apresentam-se no gel em forma de arrastes verticais. A degradação pode ocorrer devido a contaminação por DNAses e RNAses (MARDAN-NIK et al., 2019; NASIRI et al., 2005).

Essas análises são de grande importância no que se refere à otimização dos resultados, tempo e custo despendidos por serviços de saúde.

b) Técnicas moleculares

PCR convencional (cPCR)

A PCR proporciona à amplificação de regiões específicas a partir de iniciadores de oligonucleotídeos pareados por complementaridade nas margens da região alvo (SINGH, 1997). Embora não existam protocolos de PCR definidos para a detecção de LT, essa técnica molecular é uma ferramenta de grande importância na pesquisa e no diagnóstico, pois é capaz de detectar DNA do parasito mesmo em lesões com baixa carga parasitária resultando em elevada sensibilidade diagnóstica (REITHINGER et al., 2007).

Em estudo realizado com amostras de área endêmica no Acre/Brasil, no ano de 2005, os pesquisadores avaliaram o uso da PCR com o alvo de kDNA no diagnóstico da LM. Neste estudo foram incluídos 35 fragmentos de biópsia de

pacientes confirmados, nos quais 34 foram positivos no teste, obtendo uma positividade de 97,1%. Resultado esse superior a outras técnicas avaliadas na pesquisa. Na imuno-histoquímica foi encontrada positividade de 68,6% e apenas 57% no exame histopatológico (OLIVEIRA et al., 2005). Ainda em 2005, Disch et al. (2005) avaliaram PCR kDNA em um grupo de 13 casos de LM e dez não casos. Os autores encontraram elevado desempenho, sendo 86,4% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Bracho et al. (2007) avaliaram a PCR convencional com dois diferentes alvos no diagnóstico da LM. Com a utilização de um padrão de referência composto, foram incluídos no estudo 61 pacientes, dos quais 36 eram casos e 25 não casos. Com o alvo de kDNA o desempenho encontrado foi de 68,6% de sensibilidade e 92% de especificidade em amostras de fragmentos de biópsia. Já com a utilização com alvo ITS rDNA a técnica demonstrou baixa sensibilidade (40%) e elevada especificidade (96%). Ainda de acordo com os autores, os valores de sensibilidade encontrados no estudo podem ter sido afetados por inibidores e contaminantes presentes em 20% das amostras avaliadas. Em estudo publicado por Fagundes et al. (2010), os pesquisadores reportaram alta de positividade (93,3%) quando avaliaram PCR kDNA em amostras obtidas por biópsia de um pequeno grupo de pacientes (n=15).

Além dos testes realizados com a utilização de amostras obtidas por forma invasiva, métodos de coleta minimamente invasivos vêm sendo avaliados associados a técnicas moleculares e tem demonstrado elevado desempenho. A utilização de escova citológica cervical na coleta das amostras demonstrou alto desempenho no diagnóstico da LM por PCR convencional de kDNA, sendo 95,7 % de sensibilidade e 90,0% de especificidade (BOGGILD et al., 2011).

Boggild et al. (2010) compararam métodos tradicionais para a detecção da LC (cultura, PCR de aspirados e raspados de lesões, esfregaço e teste cutâneo de *Leishmania* – LST) com a PCR a partir de amostras obtidas de forma não invasiva, com a utilização de papel filtro. O estudo foi realizado no Peru e foram recrutados 45 pacientes, sendo 66 lesões de LC no total. Dessas, 48 lesões foram positivas por PCR utilizando as impressões das lesões em papel filtro, obtendo 92,3% (IC 95%, 85,1% –99,5 %) de sensibilidade e 100,0% de especificidade. A PCR das

impressões da lesão em papel de filtro obteve a mesma sensibilidade da PCR realizada com amostras invasivas ($p = 0,930$).

Com objetivo de avaliar o desempenho da cPCR kDNA associado a amostras obtidas de forma menos invasivas, Gomes et al. (2014), recrutaram 17 pacientes confirmados com LM, 19 com LC e 33 controles negativos. Foram obtidas amostras de saliva, raspado de mucosa oral com a utilização de papel filtro e exsudato nasal obtido por *swab*. No diagnóstico do grupo LM, a PCR kDNA realizada com exsudatos nasais obtidos por *swab* demonstrou maior acurácia (86%) e sensibilidade (58,82%).

Comercialmente disponível em outros países, o *Leishmania OligoC-Test* é um teste molecular que consiste na amplificação do alvo 18S ribossomal no qual a leitura do resultado é realizada por cromatografia. O teste é produzido pela Coris BioConcept/Bélgica, e de acordo com o fabricante possui alto desempenho, sendo 93% de sensibilidade e 100% de especificidade (CORIS BIOCONCEPT, 2020). No Peru, Espinosa et al. (2009) avaliaram o teste em 45 amostras de pacientes sabidamente positivos para LC. Os pesquisadores encontraram sensibilidades de 92% quando avaliado em raspado da lesão e 74% em aspirado de lesão.

Mesmo sendo reportados bons desempenhos com a técnica, a PCR ainda está limitada a pesquisa e a centros de referência, pois é necessário infraestrutura adequada, insumos e equipamentos de alto valor agregado, como o termociclador, visto que a reação ocorre em três etapas e em distintas temperaturas. Além disso, para visualização dos resultados é necessário a realização de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, que consiste em um processo de migração de uma partícula, sob influência da eletricidade.

PCR em tempo real (qPCR)

Uma técnica variante da PCR já descrita é a PCR em tempo real (qPCR). A qPCR além de minimizar os riscos de contaminação, permite rápida detecção dos alvos e acompanhamento em tempo real da amplificação, suprimindo a necessidade da eletroforese.

Essa técnica é baseada na utilização de fluoróforos ou sondas fluorescentes e também requer equipamentos, como termociclador com sensor para captação da emissão da fluorescência gerada. A intensidade do sinal reflete a quantidade de produto amplificado e para que a fluorescência da reação seja detectável é necessário que o número de ciclos atravesse o limiar estabelecido (*cycle threshold* - CT) pelo software da qPCR (HEID et al., 1996; KUBISTA et al., 2006; NICKLAS & BUEL, 2003).

Dos sistemas de fluorescência existentes, dois são amplamente utilizados, seja para o diagnóstico de doenças ou quantificação direta e indireta de material genético. O sistema TaqMan[®] utiliza um fluorocromo ligado a uma sonda projetada especificamente para uma sequência de DNA e, portanto, detecta apenas esta sequência específica em todos os produtos gerados pela PCR. Já na tecnologia SYBR[®] Green, esse fluorocromo não é específico para uma determinada região alvo do DNA, e, portanto, ele se liga e detecta qualquer produto de fita dupla da PCR, sendo que a especificidade dessa reação ocorre apenas devido à especificidade dos iniciadores utilizados (ALONSO et al., 2003; NICKLAS & BUEL, 2003).

Em 2013, com objetivo de avaliar a técnica de qPCR kDNA no diagnóstico da LT, foi realizado no Peru um estudo prospectivo com amostras obtidas por biópsia de 156 participantes. Os autores encontraram 97,9% de sensibilidade e 87,5% de especificidade ao comparar com a técnica cPCR (JARA et al., 2013).

Em estudo publicado por Adams et al. (2014), os pesquisadores avaliaram a associação de amostras obtidas de forma menos invasiva com diferentes métodos de extração de DNA e a técnica diagnóstica de qPCR (18S;TaqMan[®]). Foram obtidos exsudatos de *swab* e aspirado da lesão de 105 pacientes com suspeita de LC. Os autores reportaram maior desempenho quando associaram amostras coletadas por *swab*, extraídas pelo kit comercial e submetidas à qPCR (98% e 84% de sensibilidade e especificidade, respectivamente).

Recentemente, com o objetivo de avaliar a acurácia da qPCR kDNA utilizando os sistemas SYBR[®] Green e TaqMan[®] associada às amostras coletadas de forma

menos invasiva (*swab*) e invasivas (biópsia), GOMES et al. (2017) recrutaram 91 participantes, sendo 36 não casos e 55 casos (18 de LM e 37 LC). Chama atenção o resultado encontrado, pois tanto com a utilização de *swab* como com a utilização da biópsia, os autores reportaram maior sensibilidade com a qPCR SYBR[®] Green (87,88% e 84,72% respectivamente) quando comparado com a tecnologia TaqMan[®] (78,79 % com *swab* e 73,61% com fragmento de biópsia). Em ambas as técnicas de qPCR, a especificidade encontrada foi de 100%.

Ainda em 2017, Boni et al. (2017) avaliaram a acurácia de métodos moleculares associados à coleta das amostras através de *swab*. Dos 25 participantes do estudo, 14 eram positivos para LM e 11 para LC. Os pesquisadores reportaram uma sensibilidade de 92,6% e 80% de especificidade na cPCR-kDNA com amostras coletadas por *swab*. Além disso, encontraram uma taxa de concordância de 86,2% entre amostras obtidas por *swab* e biópsia.

Técnicas de amplificação isotérmicas

Além das técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase, os testes baseados na amplificação isotérmica vêm sendo considerados como um avanço entre os métodos moleculares, pois são capazes de contornar algumas das limitações das PCRs. Notomi et al. (2000) desenvolveram uma nova técnica molecular denominada Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop* (LAMP). Essa técnica é baseada na amplificação de sequências de DNA sob condições isotérmicas, entre 60 e 65 °C por um curto período, sendo em torno de uma hora.

A reação do LAMP envolve um processo cíclico com síntese e deslocamento da fita de DNA através da função helicase executada pela enzima *BST* Polimerase. Além disso, são utilizados um conjunto de dois iniciadores internos (FIP e BIP) e dois externos (F3 e B3). Com objetivo de acelerar a reação são acrescentados dois iniciadores denominados *loop forward* e *loop backward* que são responsáveis pela formação do *loop* da reação, onde a estrutura do DNA fica semelhante a um haltere (DENG et al., 2019; NZELU, KATO & PETERS, 2019).

Essa técnica pode ser considerada superior às técnicas de PCR devido a maior especificidade, atribuída ao maior número de iniciadores utilizados; a simplicidade e redução de custos na execução, por não necessitar de aparelhos de alto valor, podendo ser realizado em aparelhos simples, como banho-maria; a amplificação também pode ser realizada com RNA bastando acrescentar a enzima transcriptase reversa; além da visualização do resultado, que pode ser realizada a olho nu, com a adição de corantes (NZELU, KATO & PETERS, 2019). A associação da simplicidade, rapidez e precisão desse teste vem possibilitando sua aplicação em vários tipos de análise, inclusive no diagnóstico da LT (MORI & NOTOMI, 2019). No diagnóstico da forma LC da doença, através da utilização do alvo DNA ribossômico (rDNA) 18S, Adams et al. (2010) reportaram elevada sensibilidade da técnica, 94%.

Desenvolvido por uma empresa japonesa, o kit *Loopamp Leishmania Detection* (Eiken Chemical Co. Tokyo, Japan) utiliza como alvo as regiões kDNA e 18S rDNA. Em 2018, o kit foi avaliado em um estudo prospectivo de coorte com 105 pacientes no sudoeste da Colômbia. Amostras das lesões foram coletadas com *swab* e avaliadas com a utilização do LAMP. Os pesquisadores concluíram que o teste é sensível para o diagnóstico de LC, pois encontraram elevado desempenho (95% de sensibilidade e 86% de especificidade) (ADAMS et al., 2018).

No Brasil, são escassos os estudos que abordam a técnica de LAMP associado ao diagnóstico da LT, mas, recentemente em 2019, Celeste et al. (2019) desenvolveram reação de LAMP específica para kDNA de *L. amazonensis* (CELESTE et al., 2019). Essa espécie pode causar LC, LM, LCD e até leishmaniose visceral. Os autores encontraram 89% de sensibilidade e 100% de especificidade quando comparado a PCR convencional. No mesmo ano, mas para leishmaniose visceral, em estudo realizado pela FIOCRUZ/MG os pesquisadores também desenvolveram e avaliaram um novo ensaio LAMP para detecção do gene codificador do antígeno K26 do complexo *L. donovani* e compararam com PCR convencional para o alvo kDNA. Foram reportados elevado desempenho (98,2% de sensibilidade e 98,1% de especificidade) e excelente concordância entre os ensaios ($K = 0,96$) (AVELAR, CARVALHO & RABELLO, 2019).

Ainda dentre as técnicas isotérmicas que vêm sendo estudadas para o diagnóstico da LT, estão a Amplificação Baseada na Sequência de Ácidos Nucléicos (NASBA) e a Amplificação Isotérmica da Recombinase Polimerase (RPA). O NASBA consiste especialmente na amplificação de RNA com a utilização de transcriptase reversa e outras duas enzimas e iniciadores específicos para o alvo de RNA. Essa técnica foi avaliada em associação com o teste de oligocromatografia no diagnóstico da LC no Sudão. Saad et al. (2010) reportaram 100% de especificidade e sensibilidade entre 95,7% e 100%.

A RPA é um método simples, de rápida realização (em torno de 20 min) e que se baseia na utilização de proteínas que evitam a etapa de desnaturação na PCR, e assim como no LAMP, utiliza uma enzima DNA polimerase com atividade de deslocamento de fita para extensão dos iniciadores (PIEPENBURG et al., 2006). Em 2016, a RPA foi avaliada para o diagnóstico da LT. A técnica demonstrou um limite de detecção de 0,1 parasito por reação. Além disso, os pesquisadores avaliaram 13 amostras clínicas obtidas por biópsia e relataram 100% de concordância do ensaio com a qPCR SYBR[®] Green (SALDARRIAGA et al., 2016).

Atualmente, as técnicas de amplificação isotérmicas descritas anteriormente possuem reivindicação de patentes relacionadas a elas. A patente de código US20080182312/ Todd Denison Pack está relacionada ao LAMP e expirou recentemente, em 02/01/2020 (CINCINNATI & CINCINNATI, 2008). Em relação ao teste NASBA está publicada a patente US7803579B2 (validade: 29/10/2023) (MITANI et al., 2010). Para o teste RPA estão registradas duas proteções patentárias, sendo US7270981/Alere San Diego Inc. com validade até 31/03/2024 e US20120129173A1/ Alere San Diego Inc. com vigência até 13/01/2032 (LONDON; ALBANS, 2007).

No Quadro 2 consta uma visão geral de estudos anteriores, onde os autores avaliaram técnicas moleculares para o diagnóstico da LT no Novo Mundo. Os artigos foram selecionados na base de dados *Medline* do PubMed, entretanto a busca realizada não consiste em uma revisão sistemática.

Quadro 2 Visão geral dos métodos moleculares para diagnóstico de leishmaniose cutânea e mucosa utilizados em estudos anteriores no Novo Mundo.

Doença	Técnica molecular	Alvo	Amostra (n)	Método de extração DNA	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Teste de referência	Referência	
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	cPCR	kDNA	Fragmento de biópsia (168)	Kit comercial	92,3	93,3	1 ou + entre: <i>imprint</i> , cultura e histopatologia	Fagundes et al. (2010)	
			Urina (108)	<i>in house</i> (sedimentação)	20,9	100	Exame direto, cultura e PCR (raspado de pele e mucosa)	Veland et al. (2011)	
	qPCR		Fragmento de biópsia (156)	Kit comercial	97,9	87,5	qPCR-G6PD	Jara et al. (2013)	
			Escarificação (14); Fragmento de biópsia (192)	Kit comercial	92	77	cPCR kDNA	Tsukayama et al. (2013)	
	qPCR ¹		Aspirado de lesão (58)	Kit comercial	68,4	95	1 ou +: histopatologia, cultura, esfregaços e PCR convencional de amostras de biópsia ou swab	Osiro Bergmann et al. (2019)	
	<i>Polymorphism-Specific</i> PS-PCR		-	Raspado de lesão (63)	<i>In house</i> fenol-clorofórmio	81	84,2	Exame clínico, exame direto e teste cutâneo de Montenegro	Marco et al. (2012)
	OligoC-Test ²		18S	Biópsia (56)	Kit comercial	92,9	100	Exame direto e/ou cultura	Deborggraeve et al. (2008)

Doença	Técnica molecular	Alvo	Amostra (n)	Método de extração DNA	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Teste de referência	Referência
LEISHMANIOSE CUTÂNEA	cPCR	kDNA	Escarificação da lesão (170)	Tampão Tris EDTA	100	82,84	Exame direto	Neitzke-Abreu et al. (2013)
			Sangue (89)	Guanidina-fenol (VENAZZI et al., 2007)	65,63	92,98		
			Papel filtro	<i>in house</i> (fenol:clorofórmio)	98,7	57,1	Cultura ou exame direto positivo ou 2 ou + PCRs	Bensoussan et al. (2006)
			Fragmento de biópsia (119)	Kit comercial	95,4 (subgênero) 88,2 (gênero)	100,0	Clínico, epidemiológico, resposta terapêutica e 1 ou + entre: parasitológico, histopatológico, cultura e RIFI	Rodrigues et al. (2002)
		kDNA (De Bruijn & Barker, 1992)	Fragmento de biópsia (383)	Feno/clorofórmio/álcool isoamílico	75,7	96,4	1 ou +: exame direto, cultura e PCR	Weigle et al. (2002)
		kDNA (Vergel;Walker; Saravia, 2005)	Escarificação em papel de filtro (200)	Chelex 100 resin	94,0	88,0	1 ou +: exame direto, cultivo e/ou PCR de escarificação em tampão	Miranda et al. (2012)
				Kit comercial	60,0	62,0		

Doença	Técnica molecular	Alvo	Amostra (n)	Método de extração DNA	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Teste de referência	Referência
LEISHMANIOSE CUTÂNEA	cPCR	ITS	Cultivo (75)	Kit comercial	98,8	100,0	Parasitológico	Shahbazi et al. (2008)
			Aspirado (75)		80,0	100,0		
		ITS1	Papel filtro	<i>in house</i> (<i>fenol:clorofórmio</i>)	91,0	100,0	Cultura ou exame direto positivo ou 2 ou + PCRs	Bensoussan et al. (2006)
			Fragmento de biópsia (99)	Kit comercial	81,4	-	PCR-kDNA	Graça et al. (2012)
		SLME	Papel filtro	<i>in house</i> (<i>fenol:clorofórmio</i>)	53,8	100	Cultura ou exame direto positivo ou 2 ou + PCRs	Bensoussan et al. (2006)
		hsp70	Fragmento de biópsia (99)	Kit comercial	73,2	-	PCR-kDNA	Graça et al. (2012)
		G6pd			41,6	-		
	LAMP	18S	Amostras coletadas por swab (105)	DNeasy blood and tissue Kit (Qiagen, USA)	95	86	Exame direto e/ou cultura	Adams et al. (2018)
			Esfregação direto da lesão (50)	Kit comercial	100	71,4	Microscopia	León et al. (2018)
					100	90,9	qPCR	

Doença	Técnica molecular	Alvo	Amostra (n)	Método de extração DNA	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Teste de referência	Referência
LEISHMANIOSE MUCOSA	cPCR	kDNA	Fragmento de biópsia ³ (21)	Kit comercial	100	100	Exame clínico e cultura	Thomaz-SoccoL et al. (2011)
			Fragmento de biópsia (13)	Kit comercial	86,4	100,0	Resposta terapêutica	Disch et al. (2005)
		kDNA (Rodgers et al., 1990)	Fragmento de biópsia (61)	fenol:clorofórmio (ISAZA' et al., 2002)	68,6	92	Clínico, histopatológico, resposta terapêutica e 1 ou + entre: IDRMs, presença de cicatriz cutânea e epidemiológica compatível	Bracho et al. (2007)
		ITS (Cupolillo et al., 1995)			40	96		

Legenda: ¹Os valores de desempenho se referem aos resultados da qPCR e/ou cultura); ²Teste comercial; ³Forma clínica descrita no artigo como leishmaniose cutaneomucosa.

Identificação de espécies por PCR-RFLP

A técnica *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) ou polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição é baseada na restrição de um fragmento de DNA por enzimas endonucleases. Essas enzimas clivam a molécula em sítios específicos gerando assim, perfis de restrição (ROTUREAU et al., 2006; VOLPINI et al., 2004). Esta técnica associada a PCR, conhecida como PCR-RFLP é baseada na amplificação de um fragmento específico e a sua subsequente restrição com as enzimas endonucleases (GARCIA et al., 2007).

Dentre os fatores associados às manifestações clínicas da LT, um fator relevante é a espécie do parasito causador da infecção. Com isso, visando auxiliar o diagnóstico, a conduta terapêutica e estudos epidemiológicos, a identificação de espécies por PCR-RFLP tornou-se uma importante ferramenta, principalmente em regiões do Brasil onde a espécie *L. guyanensis* é predominante. O desempenho da PCR-RFLP depende não apenas da própria técnica, mas também dos métodos de amostragem e extração de DNA (GARCIA et al., 2007).

Diversas regiões gênicas de *Leishmania* têm sido empregadas como alvo em estudos de genotipagem. Dentre elas, as regiões de kDNA e ITS, e os genes que codificam as proteínas de choque térmico como o *hsp70* (GONÇALVES, 2018; MONTALVO et al., 2017; PEREIRA et al., 2017; WEIRATHER et al., 2011).

A utilização da PCR-RFLP (alvo *hsp70*) foi avaliada na identificação de cepas de *Leishmania* em fragmentos de tecidos de 99 pacientes confirmados para LC. Os autores reportaram o gene *hsp70* (234 pb) como um alvo válido e sensível para detecção de *Leishmania*. Após restrição por PCR-RFLP, o ensaio de PCR foi comparado com outros alvos utilizados para o diagnóstico molecular de leishmaniose: *hsp70* (região de 1400 pb), (ITS) 1 e desidrogenase de glicose-6-fosfato (G6pd). Foi observada uma boa concordância entre os métodos quanto à identificação das espécies de *Leishmania* (GRAÇA et al., 2012).

Garcia et al. (2007) avaliaram o uso da PCR-RFLP (alvo *hsp70*) para identificação de espécies de *Leishmania* em amostras (n=44) de raspados de pele coletadas das

lesões com auxílio de palitos de madeira. A espécie *Leishmania braziliensis* foi identificada em 93% das amostras, enquanto *L. lainsoni* foi identificada em 7%. Os autores ressaltam ainda a importância da coleta realizada de forma menos invasiva e suas vantagens, como poder ser realizada a nível ambulatorial e em menor espaço de tempo, além da economia em recursos. Para LM, em casos de lesões profundas, os pesquisadores sugerem no estudo a realização de aspiração do exsudato. Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram identificação de espécies de *Leishmania* a partir de amostras obtidas por *swab*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar dois métodos de extração de DNA em amostras obtidas por *swab* associados às técnicas moleculares de PCR convencional (kDNA e RFLP-hsp70), PCR em tempo real (TaqMan[®] SSU rRNA e SYBR[®] Green kDNA) e LAMP-RT 18S para o diagnóstico de pacientes com suspeita de LT.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a integridade e o rendimento do DNA genômico extraído de amostras de pele e mucosa nasal coletadas por *swab* utilizando duas diferentes técnicas de extração de DNA;
- Comparar o desempenho da PCR convencional (kDNA), qPCR (TaqMan[®] SSU rRNA e SYBR[®] Green kDNA) e LAMP-RT 18S extraídas por diferentes técnicas para o diagnóstico de LT;
- Avaliar a aplicabilidade de amostras clínicas obtidas por *swab* para a identificação de espécies de *Leishmania* por PCR-RFLP.

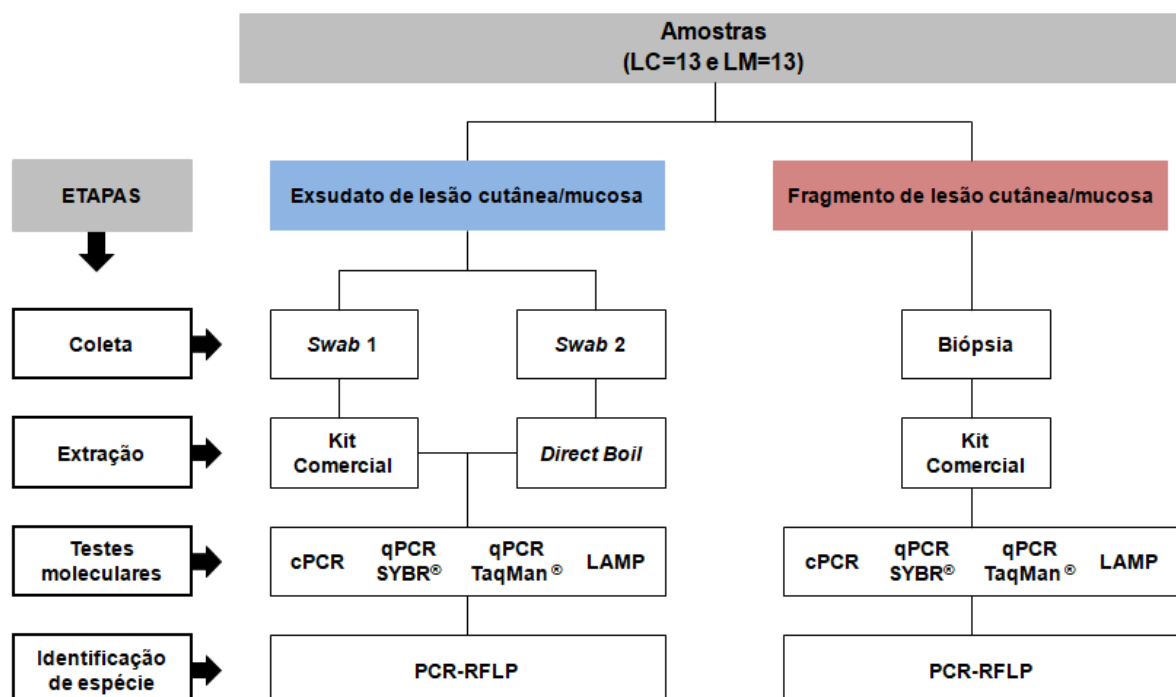
5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Delineamento do estudo e considerações éticas

Este estudo foi projetado para comparar a metodologia de coleta de amostras por *swab* associada a duas técnicas de extração de DNA, sendo elas, kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini kit (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, EUA) e “*Direct Boil*” (DB). Quatro ensaios moleculares (cPCR kDNA; qPCR SYBR® Green kDNA; qPCR TaqMan® SSU rRNA; LAMP-RT 18S) foram avaliados na amplificação do DNA de *Leishmania* a partir dessas amostras e a identificação das espécies foi realizada com PCR-RFLP hsp70.

O grupo amostral do estudo foi composto por 26 participantes adultos com LT (13 LC e 13 LM). O diagnóstico foi confirmado por PCR kDNA que é considerada uma técnica de referência para leishmaniose (DISCH et al., 2005). A Figura 2 mostra o fluxograma geral do estudo.

Figura 2 Fluxograma geral do delineamento do estudo



Esse trabalho foi conduzido seguindo as normas de pesquisas envolvendo seres humanos presentes nas Resoluções 466/2012 e 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde. Todos os indivíduos participaram voluntariamente do estudo e o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A) foi assinado individualmente por cada participante. O Comitê de Ética em Pesquisa do IRR/FIOCRUZ aprovou este estudo (CAAE: 44545315.7.0000.5091), assim como o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CAAE: 32343114.9.0000.5149). Os documentos de aprovação estão no ANEXO A.

O processamento das amostras, assim como os testes avaliados no presente estudo foram realizados no PCPP/IRR (FIOCRUZ) de Belo Horizonte/MG.

5.2 Coleta e preparação das amostras clínicas

A coleta das amostras foi realizada nos ambulatórios do Centro de Referência em Leishmanioses do IRR/FIOCRUZ e no de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas, anexo São Geraldo (UFMG). De cada paciente (n=26) foram coletadas duas amostras de exsudatos da lesão de pele/mucosa nasal por *swab* e um fragmento de pele/mucosa por biópsia.

Inicialmente, foi realizada a limpeza da lesão com solução fisiológica 0,9% e a retirada de crostas, com ajuda de gaze úmida e pinça. As coletas por *swab* foram realizadas por profissionais da saúde não médicos, como biólogo e enfermeiro. A coleta foi realizada através da fricção suave do *swab* e giro de 360° em toda a lesão por cinco vezes. Os *swabs* foram colocados em dois microtubos distintos (um de 1,5 mL e outro de 0,6 mL) estéreis contendo 200 µL de solução salina a 0,9%, onde tiveram suas hastes cortadas e foram imediatamente armazenados a -20 °C por até três semanas antes da extração do DNA.

Após a coleta das amostras por *swab* foi realizada a anestesia do local, através da aplicação de cloridrato de lidocaína a 2 %. A coleta do fragmento da lesão foi realizada por meio de biópsia por profissional médico. Nos pacientes com lesão cutânea, o fragmento de tecido foi coletado na borda interna da lesão, com a utilização de um instrumento cirúrgico cortante circular (*punch*) de quatro milímetros

de diâmetro. Esse material foi dividido em duas partes, na qual uma foi utilizada para confecção de lâminas para o exame parasitológico direto (*imprint*) e em seguida foi armazenada em freezer a -20°C até a extração do DNA. A outra parte do fragmento foi colocada em microtubo estéril de 1,5 mL contendo cerca de 200 μL de formaldeído e enviado para análise histopatológica (exame realizado na rotina do CRL/IRR/FIOCRUZ).

Já nos pacientes que apresentavam a forma mucosa, a coleta dos fragmentos da mucosa nasal foi realizada com a utilização de uma pinça cirúrgica para biópsia do tipo “saca-bocado”. Foram coletados três fragmentos, no qual um foi colocado em microtubo de 1,5 mL vazio e seco, para extração de DNA; o segundo foi colocado em tubo contendo cerca de 200 μL de solução fisiológica para realização de cultura para diagnóstico diferencial (fungos); e o terceiro fragmento foi colocado em microtubo de 1,5 mL contendo cerca de 200 μL de formaldeído para análise histopatológica (teste realizado na rotina do diagnóstico da LM nos Centros de Referência).

5.3 Métodos de extração de DNA

Para avaliar o impacto do método de extração de DNA, dois diferentes protocolos foram testados e avaliados em todas as amostras: o Kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, EUA) usado nas amostras coletadas por biópsia e em uma das amostras coletadas por *swab* e a técnica DB usado na outra amostra coletada por *swab*.

A extração usando o kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, EUA) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, e consistiu nas seguintes etapas sequenciais: no microtubo de 1,5 mL contendo um dos *swabs* foi adicionado 200 μL de solução fisiológica 0,9 %; 20 μL de Proteinase K; 400 μL do tampão Purelink™ Genomic Lysis/Binding, e em seguida todo material foi homogeneizado durante 5 s com a ajuda de vortex (Genie 2, São Paulo, SP, Brasil) e incubado em termobloco (Dry Bath Incubator/Boekel Scientific, Feasterville, PA) a 56°C durante 10 minutos. Após o tempo de incubação, com o auxílio de uma pinça

metálica, o *swab* foi pressionado contra a parede do tubo e em seguida transferido para um microtubo novo e armazenado em freezer a - 20°C. No microtubo com o conteúdo e agora sem o *swab*, foi adicionado 200 µL de álcool etílico absoluto (LS Chemicals, Mumbai, Maharashtra, Índia) e homogeneizado por 5 segundos. Com auxílio de uma pipeta de 1000 µL, o conteúdo do microtubo foi transferido para coluna com filtro e submetido à centrifugação (Centrifuge 5425/Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 12.000 rpm durante 1 minuto. Após centrifugação o tubo coletor foi substituído por um novo e foi adicionado na coluna com filtro, 500 µL do tampão *Genomic Wash 1* e novamente centrifugado a 12.000 rpm durante 1 minuto; o tubo coletor foi mais uma vez substituído por um novo e foi adicionado 500 µL do segundo tampão de lavagem, *Genomic Wash 2* e centrifugado a 13.200 rpm durante 3 minutos. Após a etapa de lavagem, o tubo coletor foi substituído por um microtubo novo e estéril de 1,5 mL com tampa, e então foi acrescido sobre a coluna com filtro 100 µL do tampão de eluição (*Genomic Elution*). O conteúdo foi incubado em temperatura ambiente por 1 minuto; em seguida o sistema de tubos (coluna de filtro inserida no microtubo com tampa) foi centrifugado a 13.200 rpm durante 1 minuto. Ao término, a coluna com filtro foi descartada e o microtubo com o conteúdo, agora eluído, foi identificado e armazenado em freezer a -20 °C até os procedimentos subsequentes. Para a extração dos fragmentos coletados por biópsia, a única diferença no protocolo descrito acima consiste no tempo mais prolongado de incubação em termobloco a 56°C, sendo o mínimo de 4 horas.

A técnica DB foi realizada a partir de um protocolo modificado baseado em Imai et al. (2018). Em microtubo de 0,6 mL contendo *swab* foi adicionado 100 µL de solução fisiológica com triton x-100 (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) a 1%. O tubo com o conteúdo foi submetido à incubação em termobloco (Dry Bath Incubator/Boekel Scientific, Feasterville, PA) a 100°C durante 10 minutos. Após o tempo de incubação o aparelho de termobloco foi desligado para diminuição da temperatura e subsequente manuseio (aproximadamente 5 min). Em capela de segurança biológica, com auxílio de uma pinça metálica, o *swab* foi pressionado contra a parede do tubo e descartado. Posteriormente, para fins de padronização o volume final foi normalizado para 100 µL. Ao fim, o microtubo de 0,6 mL contendo o material extraído foi identificado e armazenado em freezer a -20°C até o momento do uso.

Para evitar a contaminação cruzada, diferentes conjuntos de pipetas, tubos e insumos, além de diferentes áreas de trabalho foram designados para a extração do DNA, para preparação da mistura de reação e à amplificação do DNA. Para contribuir na confirmação da ausência de contaminantes, foram realizados controles negativos de extração de DNA para cada experimento através da adição de todos os reagentes, exceto a amostra.

Uma comparação do custo dos reagentes e materiais utilizados e dos aspectos operacionais (tempo de processamento das amostras, equipamentos necessários) foi realizada entre os dois métodos de extração. O custo da extração utilizando o kit comercial foi estimado a partir do preço do kit (lista do fabricante de 2019) dividido pelo número de amostras processadas (250) e outros reagentes necessários. Para o método DB o custo foi estimado a partir dos reagentes necessários para realização da extração. O custo final foi apresentado por reação. O tempo de processamento das amostras foi calculado utilizando-se um cronômetro durante a execução dos ensaios. A contagem foi iniciada a partir da adição do primeiro reagente e finalizada após a etapa de eluição do DNA. O tempo total calculado corresponde ao processamento de 10 amostras.

5.4 Controle de qualidade do DNA

A concentração e a pureza do DNA foram determinadas usando o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). As razões de absorvância A_{260/280} e A_{260/230} foram analisadas para verificar a pureza do DNA obtido: A_{260/280} nm para contaminação por proteínas e A_{260/230} nm para contaminação por sais. A integridade do DNA extraído das amostras foi analisada por eletroforese em géis de poliacrilamida 6%, corados em nitrato de prata. As amostras foram diluídas para uma concentração de 10 ng e submetidas à eletroforese de forma direta, sem passar por amplificação.

5.5 Métodos moleculares para amplificação do DNA de *Leishmania* e identificação de espécies

5.5.1 Condições gerais utilizadas nas técnicas moleculares.

As quatro técnicas moleculares (cPCR kDNA; qPCR SYBR[®] Green kDNA; qPCR TaqMan[®] SSU rRNA e LAMP-RT 18S) foram realizados com todas as amostras (fragmentos coletados por biópsia e exsudatos coletados por *swabs*) para avaliar o desempenho dos dois métodos de extração na amplificação do DNA de *Leishmania*. Todos os ensaios incluíram controles negativos (sem DNA e controle para o processo de extração de DNA) e positivos (DNA genômico extraído da cepa de referência dos controles *L. (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903). Todos os testes foram realizados em duplicada. As informações sobre os alvos dos testes e sequência dos iniciadores estão descritas no Quadro 3.

Quadro 3 Informações dos alvos e oligonucleotídeos utilizados nas técnicas moleculares.

Técnica molecular	Iniciadores	Alvo	Sequência do nucleotídeo (5' - 3')	Amplicon (pb)
cPCR ^a	L150/L152	kDNA	Senso: GGG(G/T)AGGGG CGT TCT (G/C)CG AA Antisenso: (G/C)(G/C)(G/C)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC	120
qPCR ^b SYBR [®] Green	L150/L152	kDNA	Senso: GGG(G/T)AGGGG CGT TCT (G/C)CG AA Antisenso: (G/C)(G/C)(G/C)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC	120
qPCR ^b TaqMan [®]	U1, L1, LeishP1	SSU rRNA	Senso: AAGTGCTTTCCCATCGCAACT Antisenso: ACGCACTAAACCCCTCCAA Sonda (FAM/TAMRA): CGGTTCCGGTGTGTGGCGCC	67
LAMP-RT ^c	-	18S	F3: CGCGAAAGCTTTGAGGTTAC B3: ACAAATCACTCCACC GACC FIP: CCACGTCTTGTGGTGCCATTCC-GG GGAGTAC BIP: CGGGGAACCTTACCAGATCCGGACCACCATTCA GGGAATCGA	-

Legenda: ^aPCR convencional; ^bPCR em tempo real; ^cAmplificação Isotérmica de DNA mediada por loop.

5.5.2 Condições de amplificação dos testes moleculares

Para a PCR convencional kDNA, a reação foi realizada usando os seguintes iniciadores gênero-específicos de *Leishmania*: (i) um iniciador senso 150 (5'-GGGG / TAGGGGCGTTCTC / GCGAA-3 '); (ii) um iniciador antisenso152 (3'-C / GC / GC /

GA / TCTATA / TTTACACCAACCCC-5') direcionados para amplificação da região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania*, gerando um produto de 120 pares de base (pb) (DEGRAVE et al., 1994). A PCR foi realizada em um volume total de 25 µL contendo 0,75 U de Taq DNA polimerase em Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, solução MgCl₂ 2 mM, 0,4 mM de cada nucleotídeo (Promega Corp., Madison, WI, EUA), 0,6 µM de cada iniciador (Integrated DNA Technologies, Iowa, EUA) e 10 ng de amostra de DNA. As condições utilizadas na reação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de amplificação a 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. O equipamento utilizado foi o termociclador ProFlex™ (Applied Biosystems/Thermo Fischer Scientific, EUA).

A PCR em tempo real baseada em SYBR® Green foi realizada com os mesmos iniciadores utilizados na PCR convencional. A mistura da reação consistiu em Power SYBR® Green Master Mix 1x (Applied Biosystems, EUA), 0,3 µM de cada iniciador, 10 ng de DNA molde e água livre de nucleases em quantidade suficiente para um volume final de 25 µL. As reações foram realizadas utilizando-se uma placa de reação óptica de 96 poços no sistema de PCR em tempo real StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, EUA). A ciclagem no termociclador foi programada com uma etapa a 95 °C por 10 min para a ativação da enzima Taq DNA polimerase, seguido de 30 ciclos de amplificação de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C. As leituras de fluorescência foram realizadas durante a etapa de extensão (60 °C). Após atingir o Ct foi realizada a análise da curva de *melting* sob as seguintes condições: uma etapa de desnaturação inicial a 95 °C por 15 s, seguida por 1 min a 60 °C e aquecimento contínuo a 0,1 °C/segundo a 95 °C. A temperatura de *melting* (T_m) foi definida como o pico da curva. O cálculo da T_m para cada amplificação foi realizado pelo software do equipamento. O Ct e o *baseline* foram determinados automaticamente usando o StepOne™ Software v2.1.

Na realização da qPCR TaqMan® SSU rRNA foram utilizados o par de iniciadores LEIS.U1 (5'-AAGTGCTTTCCCATCGCAACT-3') e LEIS.L1 (5'-ACGCACTAAACCCCTCCAA -3'), desenhados para amplificar um fragmento de 67 pb e a sonda fluorescente utilizada foi a LEIS.P1 (FAM 5'-CGGTTTCGGTGTGTGGCGCC -3' TAMRA). As reações de qPCR foram realizadas

em um volume total de 20 μL , incluindo 10 ng de DNA molde, 10 μL de TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), 0,3 μM de cada iniciador e 0,25 μM da sonda. As condições de amplificação foram de 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min e 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. O Ct e o *baseline* foram determinados automaticamente usando o StepOne[™] Software v2.1.

As condições do ensaio LAMP-RT 18S incluíram incubação a 50 °C por 10 min para ativação da enzima transcriptase reversa, seguidas de 64 °C por 90 min e aquecidas a 80 °C por 2 min para inativar a enzima e finalizar a reação. Os iniciadores utilizados foram F3 (5'-CGCGAAAGCTTTGAGGTTAC-3'), B3 (5'-ACAAATCACTCCACC GACC-3'), FIP (5'-CCACGTCTTGTGGTGCCATTCCGGGGAGTAC') BIP (5'-CGGGGAACTTTACCAGATCCGGACCACCATTCAGGGAATCGA-3') (ADAMS et al., 2010). O mix da reação (25 μL) consistiu em 2,5 μL de tampão isotérmico de amplificação (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, EUA), 1,6 μM de cada iniciador FIP e BIP, 0,2 μM de F3 e B3, 8U da enzima DNA polimerase Bst-WarmStart (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, EUA); 1,4 mM de Trifosfatos desoxinucleotídeos, 1,0 M de betaína, 8 mM de MgSO_4 , 1 U da enzima transcriptase reversa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 5 μL de DNA molde. O equipamento utilizado foi o termociclador ProFlex[™] (Applied Biosystems/Thermo Fischer Scientific, EUA).

5.5.3 Análise dos produtos amplificados

Os resultados da amplificação da cPCR foram visualizados através de eletroforese, nas seguintes condições: após amplificação, 5 μL do produto obtido foram ressuspensos em 2 μL de tampão da amostra 5x (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) e aplicados em gel de poliacrilamida 6%. A corrida eletroforética foi realizada inicialmente a 90 V e 150 mA por 10 min e em seguida, por 20 min a 150V em TBE (Tris-base a 89 mM pH 8,0; ácido bórico a 89 mM e EDTA a 2 mM) em um sistema de cubas e placas de vidro com pentes para 15 amostras. Foi utilizado como marcador de peso molecular GeneRuler[™] 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Waltham, Massachusetts, EUA). Em seguida, os géis foram corados pelo nitrato de prata 0,2% (Santos et al. 1993).

Os resultados das amplificações por LAMP-RT 18S foram visualizados a olho nu, com base na fluorescência após adição de 1 µL (1:10) de SYBR[®] Safe (Invitrogen, Califórnia, CA), sendo que a coloração laranja indica resultado negativo e a verde fluorescente, resultado positivo. A visualização da fluorescência também foi realizada em um transiluminador (Loccus, São Paulo, SP, Brasil). Para confirmação adicional os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese e visualizados em géis de poliacrilamida 6%, corados com nitrato de prata.

5.5.4 Identificação de espécies

A PCR-RFLP hsp70 foi realizada para identificar as espécies de *Leishmania* nas amostras de fragmento de biópsias e exsudatos coletados por *swab* (adaptado de (GRAÇA et al., 2012). A reação de PCR foi realizada em um volume total de 25 µL, incluindo 10-50 ng de DNA molde, 2 U da enzima Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), tampão para PCR 1x (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4 e KCl 500 mM), 0,4 µM de cada iniciador hsp70 (senso 5'-GGACGAGATCGAGCGCATGGT-3' e antiseno 5'-TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG-3'), 2,0 mM MgCl₂ e 0,2 mM dNTPs (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). O protocolo de ciclagem consistiu em uma etapa de desnaturação a 94 °C por 4 min, seguida por 33 ciclos a 94 °C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. Uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 minutos foi realizada. Para a análise de RFLP, as enzimas de restrição *HaeIII* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e *BstUI* (Bio Labs, Nova Inglaterra) foram usadas em reações independentes, de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de restrição obtidos foram visualizados em géis de poliacrilamida 6%, corados com nitrato de prata, conforme descrito no item anterior. Foram utilizadas as seguintes cepas referências de DNA de *Leishmania*: *L. (V.) braziliensis* (M2903), *L. (V.) guyanensis* (M4147), *L. (V.) naiffi* (M5533), *L. (L.) amazonensis* (PH8) e *L. (L.) infantum* (PP75), gentilmente cedidas pelo Grupo de Estudos em Leishmanioses (GEL) do IRR/FIOCRUZ.

5.6 Análise estatística

Os dados foram analisados no Medcalc (Medcalc Software, Stata Software). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para determinar a distribuição paramétrica ou não paramétrica dos dados quantitativos. Os dados foram expressos em mediana \pm DP. Os testes de Mann-Whitney foram utilizados para comparar o rendimento e a qualidade do DNA obtidos em amostras de *swab*. O teste *t* de duas amostras foi usado para determinar se os valores médios de Ct das amostras de *Leishmania* na qPCR SYBR[®] Green kDNA eram os mesmos entre os dois protocolos de extração avaliados. A sensibilidade dos testes moleculares foi calculada considerando os diferentes tipos de métodos de extração associados às amostras de coletadas por biópsia ou *swab*. A sensibilidade foi calculada usando a tabela de contingência 2 a 2 com intervalo binomial exato de confiança de 95% (IC 95%). O teste de McNemar foi usado para estimar diferenças estatísticas entre pares de testes. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

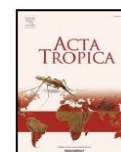
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Artigo



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

Impact assessment of different DNA extraction methods for non-invasive molecular diagnosis of tegumentary leishmaniasis

Verônica Cardoso Santos de Faria^{a,b}, Denise Utsch Gonçalves^a, Arthur Ribeiro Cheloni Soares^b, Pedro Henrique Barbosa^b, Juliana Wilke Saliba^b, Carolina Senra Alves de Souza^b, Gláucia Fernandes Cota^b, Daniel Moreira de Avelar^{b,*}

^a Post-Graduate Program of Infectology and Tropical Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, CP: 486, CEP: 31.270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Fundação Oswaldo Cruz, Instituto René Rachou, Grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias, CP: 1743, CEP: 30190-002 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Cutaneous leishmaniasis
Mucocutaneous leishmaniasis
Non-invasive samples
DNA extraction
RT-PCR
LAMP

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate two methods of nucleic acid extraction (spin-column-based method – commercial kit and direct boil - DB) from swab sampling compared to biopsy sampling for the diagnosis of tegumentary leishmaniasis (TL), (cutaneous - CL and mucocutaneous - MCL forms). The impact of these nucleic acid extraction protocols on different types of PCR and LAMP techniques were compared regarding nucleic acid quality, molecular assays accuracy, indirect quantitation, and costs. The evaluated patients were 57 TL cases (36 CL and 21 MCL) and 34 non-cases. Swab samples extracted by the DB method showed a higher DNA degradation rate and worse DNA quality in comparison to the commercial kit. Molecular tests performed on biopsy samples showed identical or higher performance in all analysis, as compared to their own performance on swab samples for TL (CL and MCL). However, only the SSU rRNA TaqMan™ RT-PCR test showed a significant difference between the performance of biopsy and swab samples extracted by commercial kit. The kDNA-cPCR coupled with swab extracted by commercial kit showed the highest accuracy (95.6%) for TL diagnosis. The sensitivity of the LAMP-RT 18S method in swab samples extracted with a commercial kit (82.5%) was close to that found in biopsy samples (86%) for TL diagnosis. The DB extraction method presented the lowest cost. The use of swab as a minimally-invasive sampling method, associated with an efficient nucleic acid extraction protocol, may represent a low-cost alternative for the diagnosis of CL and MCL.

1. Introduction

Tegumentary leishmaniasis (TL) is a public health problem due to its morbidity and mortality and broad geographic distribution (Bezerra et al., 2018). The World Health Organization (WHO) lists TL as one of the neglected tropical diseases that primarily affect low-income people who have difficulty accessing healthcare services (Alvar et al., 2012). In the Americas, more than 46,000 cases of TL were reported in 2018 (Pan American Health Organization 2019). TL presents a wide spectrum of clinical manifestations, which are directly correlated with the disease's immunopathogenesis process that occurs in the cutaneous leishmaniasis (CL), disseminated leishmaniasis (DL), and mucocutaneous leishmaniasis (MCL) forms (Burza et al., 2018).

TL diagnosis has been based on the association of clinical

characteristics, epidemiological data, and results of laboratory tests (Goto and Lindoso, 2010). Currently, no single reference test exists, and the diagnosis of TL needs to be specific, given that the existing treatment exposes patients to considerable toxicity (Burza et al., 2018; Kurizky et al., 2018).

The direct search for amastigotes in lesions remains the main test in laboratories of primary health care centers, but the sensitivity is low (Goto and Lindoso, 2010; Kurizky et al., 2018). For MCL, direct search for amastigotes is not sensitive for diagnosis, since the intense inflammatory reaction causes a decrease in the parasite burden in the lesion (Boggild et al., 2011). The immunological tests, such as the *Leishmania* skin test and serology, can achieve acceptable sensitivity, but tend to be poorly specific (Kurizky et al., 2018; Gomes et al., 2014).

Molecular methods based on nucleic acid amplification are very

* Corresponding author.

E-mail address: daniel.avelar@fiocruz.br (D.M. de Avelar).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106275>

Received 22 June 2021; Received in revised form 9 December 2021; Accepted 10 December 2021

Available online 11 December 2021

0001-706X/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

accurate and proper for the identification of the *Leishmania* species (Reithinger and Dujardin, 2007). Polymerase Chain Reaction (PCR) is the most commonly used method for detecting *Leishmania* DNA, mainly in cases of MCL and chronic lesions of CL, in which the simpler techniques generally fail (Burza et al., 2018; Boni et al., 2017). On the other hand, PCR platforms (conventional PCR / cPCR, and real time PCR / RT-PCR) require advanced laboratory facilities, making it difficult to implement in remote areas where TL is more frequent (Kurizky et al., 2018; Gomes et al., 2017). To overcome PCR limitations, the Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) has been developed as a field-friendly and cost-effective diagnostic tool. The main advantage of LAMP is to amplify nucleic acid under isothermal conditions with highly accurate results (Nzulu et al., 2016; Verma et al., 2017; Adams et al., 2018; Chaouch et al., 2019).

Recently, molecular methods have been shown to be accurate even when samples are taken using non-invasive methods, such as, for example, the swab (Boni et al., 2017; Gomes et al., 2017; Adams et al., 2014; Sevilha-Santos et al., 2019). Molecular assays are, however, particularly sensitive to the quality and purity of the starting DNA/RNA material, as such the choice of an efficient DNA/RNA extraction method is a critical step in achieving a successful diagnosis. Currently, various in-house or commercial methods and protocols based on the use of phenol and chloroform, silica membrane technology, magnetic beads, salting-out method, and direct boil (DB) method are available for *Leishmania* DNA/RNA extraction and purification (Tan and Yip, 2009). However, there are few studies on the analysis of the impact of the nucleic acid extraction method on the diagnosis of leishmaniasis (Adams et al., 2014; da Silva et al., 2014; Chowdhury et al., 2020). An optimal extraction technique is expected to ensure high DNA/RNA yield and integrity, as well as efficiency, in terms of execution and cost (Mabey et al., 2004; Biswas, 2016).

The DNA extraction of swab samples by DB method coupled with LAMP showed usefulness for the diagnosis of CL with the potential for being used in resource-poor regions (Imai et al., 2018; Mikita et al., 2014; Dixit et al., 2018). However, the DB method has been evaluated in a limited number of samples for TL cases (two suspected cases of CL) and only associated with the DNA amplification technique by LAMP (Sriworarat et al., 2015). This limitation justifies additional comparative studies that use different molecular techniques to ascertain its practical utility and possible limitations. Therefore, this study aims at comparing two nucleic acid extraction methods (spin-column-based and "DB" method) used in swab samples and four molecular methods (kDNA-cPCR; kDNA-SYBRTM RT-PCR; SSU rRNA TaqManTM RT-PCR; LAMP-RT 18S) for the diagnosis of TL (CL and MCL).

2. Materials and methods

2.1. Study design: reference standard, inclusion and exclusion criteria

The parameters used to compare the extraction protocols were (i) DNA quality analysis, which include the evaluation of the quantity of extracted genetic material, together with its purity and integrity; (ii) impact evaluation of extraction methods in the sensitivity, specificity, and accuracy of molecular techniques used in TL diagnoses (CL and MCL forms); (iii) indirect quantification by qPCR Cycle Threshold value analysis; and (iv) costs and processing times.

This panel-based study consisted of samples (biopsy and swab) obtained of 57 cases of TL, including 36 of CL and 21 of MCL, and 34 non-cases. The inclusion criteria included a clinical and laboratory diagnosis. For the CL diagnosis, the patient must have presented a cutaneous ulcer, with a granular bottom and infiltrated edges in a frame. For MCL diagnosis, the patient must have presented an ulcer in the oral and/or nasal mucosa, with or without nasal septum perforation, including extension to the lips, palate and nasopharynx. All the cases of TL were confirmed by positive kDNA-cPCR result (Disch et al., 2003) of the tissue obtained from a biopsy, which was considered a reference standard for

the diagnosis of TL. The non-TL group (34 non-cases) included patients with a differential diagnosis that excluded TL (22 CL and 05 MCL) and 7 samples of healthy control volunteers (swab of nasal mucosa). All samples of the non-TL group were negative in kDNA-cPCR. Patients undergoing treatment for leishmaniasis were excluded from the study.

2.2. Source of samples and sample calculation

Biopsy and swab samples from cases and non-cases of TL were provided by the Leishmaniasis Reference Center of Instituto Rene Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, and the Otorhinolaryngology Division in the Clinical Hospital of Universidade Federal de Minas Gerais. The patients were evaluated from 2016 to 2021.

The minimum sample required for this study was estimated based on a TL prevalence of 58% for the target population (patients attending the reference centers previous cited). The sample size calculation was based on tables and formula proposed by (Flahault et al., 2005). The number of controls was first estimated based on an expected specificity of 95% (Gomes et al., 2014; Gomes et al., 2017). The inclusion of 34 controls was recommended considering a minimal acceptable lowest confidence limit of 0.75 (1- α). The minimal number of TL cases was set at 47 (Flahault et al., 2005).

2.3. Samples collection and preparation

One biopsy sample and two swab samples were taken from the cutaneous and mucosal lesions of the patients. Fig. 1 shows the protocol for sample collection in MCL and CL. The obtained tissue was used for direct microscopy examination (CL suspected) and for all the molecular assays. Aspirate of culture for detection of *Leishmania* spp. was performed in patients with CL suspected (Luz et al., 2009). Two swab samples from cutaneous and mucosal ulcer lesions were taken from each TL patient to be compared with tissue samples from those same patients for diagnosis by molecular techniques. The swab was performed after removing any ulcer crust with moist gauze. A cotton swab was gently rubbed and rotated over the ulcer five times (Boni et al., 2017; Adams et al., 2014; Mimori et al., 2002). The swabs were placed into sterile tubes containing 200 μ L of 0.9% saline solution and immediately stored at -20°C for a few weeks (up to 3 weeks) before DNA extraction. The samples were coded and the execution was performed blindly, without clinical information or results from other laboratorial tests.

2.4. DNA extraction methods (index tests)

Considering the samples of the 91 patients collected by biopsy and by cotton swab, two different DNA extraction protocols were tested and evaluated:

- 1) Commercial kit PureLinkTM Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, USA), used in the biopsy samples and in one swab sample
- 2) Direct boil method (DB) used in the other swab sample.

The extraction using PureLinkTM Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, USA) kit (spin-column-based method) was performed according to the manufacturers' instructions, except for the use of RNase. This strategy was also used by Adams et al., since the reverse transcriptase step increases the sensitivity by at least 10-fold, although its use is not mandatory (Adams et al., 2010). The DB method was processed using a modified protocol based on Imai et al. (Imai et al., 2018) and Sriworarat et al. (Sriworarat et al., 2015). The resultant DNA of both protocols was eluted in 100 μ L of elution buffer (Invitrogen kit) or 0.9% saline solution (DB).

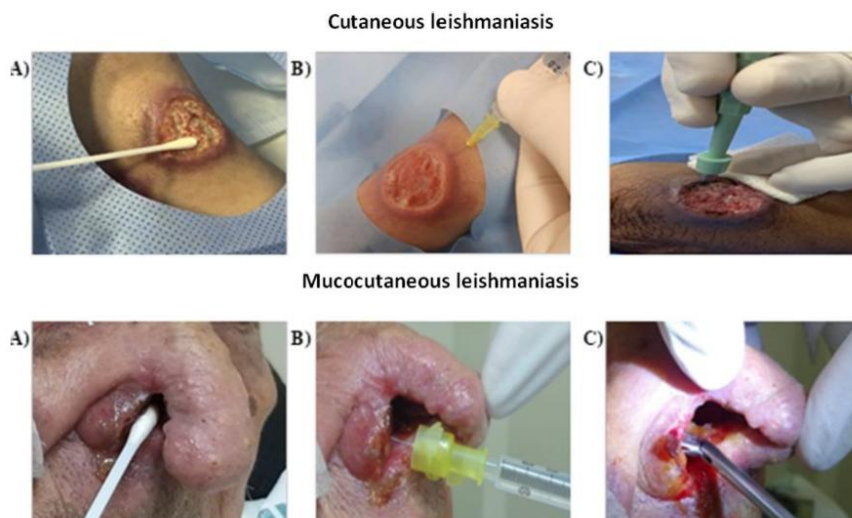


Fig. 1. Methods of obtaining samples included in the study. A) swab sample collection; B) anesthesia; C) collection of biopsy fragment.

2.5. DNA quality control

DNA quantity and purity were determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The A260/280 and 260/230 absorbance ratios were analyzed to verify the purity of the obtained DNA. The integrity of extracted DNA samples was analyzed using electrophoresis on 6% silver-stained polyacrylamide gels.

2.6. Molecular tests for leishmania DNA amplification (index tests)

All DNA samples used in the molecular tests were at a concentration of 10 ng/ μ L. The kDNA-cPCR reaction was performed following the protocol described by Dish et al. (Disch et al., 2003), with the exception of the number of cycles, which were 34 in the present study. SYBRTM Green based real time PCR was performed with the same primers used in cPCR (Disch et al., 2003) and following the protocol described by Chagas et al. (Chagas et al., 2021). The only difference was regarding the number of cycles, which were 30 in the present study. The Ct values generated were used as an indirect indication of the efficiency of the two extraction methods for purification of the *Leishmania* genomic DNA (Paulos et al., 2016). The SSU rRNA TaqManTM RT-PCR was performed with the same primers and following the protocol described by Wortmann et al. (Wortmann et al., 2001).

The LAMP-RT 18 s assay was performed with the same primers and following the modified protocol described by Adams et al. (Adams et al., 2010). The protocol was modified regarding the reaction time (90 min) and the LAMP products were evaluated by visual inspection based on fluorescence after having added 1 μ L (1:10) of SYBR green I (Invitrogen, California, CA). The positives turned green while the negatives remained orange. All PCR and LAMP assays included negative control (PCR mix without DNA/RNA and control for the process of DNA/RNA extraction) and positive control (genomic DNA extracted from the reference strain of *L. (Viannia) braziliensis* - MHOM/BR/75/M2903).

2.7. Costs and processing times to conduct the methods

A simple cost survey of the inputs and equipment that were necessary

to conduct the two extraction methods evaluated in this study was carried out similar to previous studies (Chowdhury et al., 2020; Paulos et al., 2016). In addition, the time to perform each method was estimated by a stopwatch during two experiments performed by the same professional, and the average time was the result, which is presented in hours and minutes.

2.8. Statistical analysis

Data were analyzed using Medcalc Software (Medcalc Software, Ostend, Belgium). The Kolmogorov-Smirnov test was applied to determine the parametric or non-parametric distribution of quantitative data. The non-parametric Mann-Whitney test was used to compare the DNA yield and quality obtained from the swab samples and to determine whether the median kDNA-SYBRTM RT-PCR Ct values of *Leishmania* samples were the same within the two evaluated extraction protocols (Paulos et al., 2016). Sensitivity, specificity, and accuracy of the molecular tests were calculated considering the different types of extraction methods associated with biopsy or swab samples. The results of kDNA-cPCR on biopsy samples were considered the gold standard test for molecular diagnosis of CL and MCL. The sensitivity, specificity and accuracy were calculated using two-by-two contingency table with an exact binomial 95% confidence interval (95% CI). Differences in sensitivities, specificities, and accuracies were compared using χ^2 test between pairs of tests (same test x sample type). Kappa and McNemar's test were performed to determine the concordance and discordance among the two extraction methods in combination with the four molecular methods. The Kappa index was interpreted following the criteria of Landis and Koch (Landis and Koch, 1977): <0, no agreement; 0–0.2, slight agreement; 0.2–0.4, fair agreement; 0.4–0.6, moderate agreement; 0.6–0.8, substantial agreement; 0.8–1, almost perfect agreement.

3. Results

3.1. Clinical data and assessment of the quality, quantity, and integrity of the extracted DNA

Demographic and clinical data of all participant patients are

summarized in Table 1. Twenty-three out of 36 CL patients tested positive for parasitological diagnosis (direct microscopy examination of biopsy samples and/or parasite culture). The number of lesions among patients with CL ranged from 1 to 10 lesions, and 31 patients presented the localized cutaneous form. No patient included in the study had HIV/*Leishmania* co-infection. The main demographic and clinical characteristics of cases and the results of diagnostic tests are available in Supplementary Table 1.

There was a difference in DNA quantity and purity between the two extraction methods ($p < 0.01$), (Table 2). The DB method generated the highest DNA concentration, with an average median of 80 ng/ μ L in swab samples of patients with MCL (Mann-Whitney Test, $Z = -4.8$, $p < 0.0001$) and 71.9 ng/ μ L for patients with CL (Mann-Whitney Test, $Z = -8.3$, $p < 0.0001$), (Table 2). The median values of A260/A280 and A260/230 showed that the commercial kit provided a better DNA quality for the samples. Nevertheless, the DB method gave values below the recommended levels, indicating traces of protein materials and inhibitor substances. A 1.9-fold difference was observed in the ratio of absorbance at 260 and 280 nm in swab samples of patients with MCL (median values of absorbance: commercial kit = 1.85, DB = 0.97; Mann-Whitney Test, $Z = -6.98$, $p < 0.0001$) and 1.6-fold difference in swab samples of patients with CL (median values of absorbance: commercial kit = 1.94, DB = 1.2; Mann-Whitney Test, $Z = -6.94$, $p < 0.0001$). The highest difference in the ratio of absorbance at 260 nm and 230 nm was observed in swab samples of patients with MCL (2.3-fold difference; median values of absorbance: commercial kit = 0.78, DB = 0.34; Mann-Whitney Test, $Z = -4.71$, $p < 0.0001$), (Table 2).

The integrity of extracted DNA samples was analyzed by electrophoresis on 6% silver-stained polyacrylamide gels. DNA samples of tissue biopsy extracted with method 1 (Commercial kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, USA) were used for comparison. All the swab samples extracted by commercial kit presented a high molecular weight band, indicating the presence of genomic DNA. Of the samples extracted with the commercial kit, only seven CL samples showed fragmented DNA. However, the samples extracted by the DB method contained strong smeared DNA bands and the size of DNA fragments was reduced in 94.5% of the samples.

3.2. Impact evaluation of DNA extraction methods in the performance of molecular techniques

Data regarding sensitivity, specificity and accuracy are summarized in Table 3. Molecular tests performed on biopsy samples showed

Table 1
Demographic and clinical data of TL cases (MCL and CL) included in this study.

Characteristics	TL cases (forms)	
	MCL n (%)	CL n (%)
Subjects	21 (100)	36 (100)
Age, median (range), years	68 ((21- 85)*)	47 ((13 - 86)*)
Gender, male	15 (71.4)	29 (80.6)
Active lesion on skin	4 (19)	36 (100)
Duration of lesion, median (range), months	18 ((3 - 360)*)	4 ((1 - 396)*)
Location of lesion (cases)**		
Nasal mucosa	20 (95.2)	-
Mouth (lip, tongue, and hard palate)	5 (23.8)	-
Pharynx (soft palate, uvula, amygdala, hypopharynx)	2 (9.5)	-
Upper limbs	-	12 (33.3)
Lower limbs	-	24 (66.7)
Type of lesion (cases)		
Ulcer	15 (71.4)	36 (100)
Perforation	9 (42.9)	-
Infiltration	2 (9.5)	-
Enanthema	1 (4.8)	-

* value corresponding to amplitude.

** 5 patients with lesions in more than one site.

Table 2

Concentration and purity of DNA preparations obtained by PureLink™ Genomic DNA Mini Kit and "DB technique" in cotton swab samples obtained from patients with mucocutaneous or cutaneous leishmaniasis.

Disease	Extraction method	Concentration (ng/ μ L) (Median \pm Max - Min)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ (Median \pm Max-Min)	A ₂₆₀ /A ₂₃₀ (Median \pm Max-Min)
CL	PureLink™ Genomic DNA Mini Kit	9.3 (0.1 - 59.9)*	1.94 (0.1 - 5.5)*	0.67 (0.1 - 6.1)*
	Direct boil technique	71.9 (1.65 - 1172.8)*	1.2 (0.33 - 2)*	0.4 (0.1 - 3.14)*
MCL	PureLink™ Genomic DNA Mini Kit	15.6 (1.2 - 37.3)*	1.85 (1.6 - 6.3)*	0.78 (0.4 - 2.2)*
	Direct boil technique	80 (4.2 - 516.8)*	0.97 (0.56 - 1.53)*	0.34 (0.11 - 2.75)*

MCL: mucocutaneous leishmaniasis. CL: cutaneous leishmaniasis. Median (Max-Min) *Statistical significance was estimated using the Mann-Whitney test to compare medians, $P < 0.001$.

identical or highest performance in all analysis, compared to their own performance on swab samples for TL. However, only the SSU rRNA TaqMan™ RT-PCR test showed a significant difference in performance on biopsy and swab samples extracted by commercial kit. For TL, the kDNA-SYBR™ RT-PCR/biopsy test had the highest sensitivity (94.7%) when compared to all other biopsy and swab tests. The kDNA target showed agreement considered to be "almost perfect" or "substantial", regardless of the molecular technique, the type of sample, or the extraction method (Supplementary Table 2).

In analysis stratified by clinical forms of TL, for CL, the kDNA-SYBR™ RT-PCR/biopsy showed 100% accuracy. For MCL, the kDNA-cPCR test in swab showed the best sensitivity when compared to other tests performed in biopsy and swab. The swab samples extracted by the DB method showed a lower detection rate in almost all the analysis. Only in kDNA cPCR with samples from CL the performance was identical when compared to the swab extraction using the commercial kit. The SSU rRNA TaqMan™ RT-PCR performed on the swab samples coupled with DB extraction showed the worst results for both CL and ML (Supplementary Table 3). Furthermore, SSU rRNA TaqMan™ RT-PCR showed significant disagreement values (McNemar's test) in comparative analysis regarding sample type and extraction methods (Supplementary Table 2).

3.3. Real-time PCR CT value analysis

The medians of Ct values (joint analysis of CL and MCL, $n = 45$) of the spin-column-based method and the DB technique in cotton swab samples were 22.7 and 23.7, respectively. The statistical analysis was performed using a Mann-Whitney Test, and no difference in Ct medians was found ($Z = -1.2$; $p = 0.23$).

3.4. Comparison of costs, processing times, and required materials

The DB method was the least expensive on a cost per extraction basis (US\$0.07) and required the least amount of processing time (28'). The cost and time required for the spin-column-based method were US\$2.77 and 1 h 06 min, respectively. The dry bath equipment was required for both extraction methods, while a centrifuge and an agitator were required for the spin-column-based method.

4. Discussion

In the present study, a comparative analysis of two methods of DNA extraction from swab samples was performed for the molecular diagnosis of TL. Although the use of swab associated with molecular methods for leishmaniasis diagnosis has been already evaluated (Gomes et al.,

Table 3

Sensitivity, specificity and accuracy rates of four molecular tests considering the different types of extraction methods associated with biopsy or swab samples of patients with tegumentary leishmaniasis.

Molecular Test	Sample type	Extraction method	Sensitivity n (%) [95% CI]	Specificity n (%) [95% CI]	Accuracy (%) [95% CI]
kDNA cPCR	Cotton swab	Kit	53 (93) [83 - 98.1]	34 (100) [89.7 - 100]	(95.6) [89.1 - 98.8]
		DB	49 (86) [74.2 - 93.7]	34 (100) [89.7 - 100]	(91.2) [83.4 - 96.1]
kDNA SYBR™ RT-PCR	Cotton swab	Kit	52 (91.2) [80.7 - 97.1]	34 (100) [89.7 - 100]	(94.5) [87.6 - 98.2]
		DB	47 (82.5 ^a) [70.1 - 91.3]	34 (100) [89.7 - 100]	(89) [80.7 - 94.6]
	Biopsy	Kit	54 (94.7 ^b) [85.4 - 98.9]	27 (100) [87.2 - 100]	(96.4) [89.9 - 99.3]
		DB	41 (71.9 ^{c,d}) [58.5 - 83]	34 (100) [89.7 - 100]	(82.4 ^{e,f}) [73 - 89.6]
SSU rRNA TaqMan™ RT-PCR	Cotton swab	Kit	24 (42.1 ^{g,h}) [29.1 - 55.9]	34 (100) [89.7 - 100]	(63.7 ^{i,j}) [53 - 73.6]
		DB	51 (89.5 ^{k,l}) [78.5 - 96]	27 (100) [87.2 - 100]	(92.9 ^m) [85.1 - 97.3]
	Biopsy	Kit	47 (82.5 ^a) [70.1 - 89.7]	34 (100) [89.7 - 100]	(89) [80.7 - 94.6]
		DB	34 (59.7 ⁿ) [45.8 - 72.4]	34 (100) [89.7 - 100]	(74.7 ^h) [64.5 - 83.3]
LAMP-RT 18S	Cotton swab	Kit	49 (86 ^l) [74.2 - 93.7]	25 (92.6) [75.7 - 99.1]	(88.1 ^h) [79.2 - 94.1]
		DB	49 (86 ^l) [74.2 - 93.7]	25 (92.6) [75.7 - 99.1]	(88.1 ^h) [79.2 - 94.1]
	Biopsy	Kit	49 (86 ^l) [74.2 - 93.7]	25 (92.6) [75.7 - 99.1]	(88.1 ^h) [79.2 - 94.1]

TL: tegumentary leishmaniasis; n = number of true positives (for sensitivity) or true negative (for specificity) samples in test. (sensitivity, specificity or accuracy rates in percentual).

X² test (a,b): the same letters indicate statistical differences between pairs of tests (same test x sample type). p-values: TL

- ^a p = 0.04;
- ^b p = 0.001;
- ^c 0.02;
- ^d p < 0.001;
- ^e p = 0.008;
- ^f p = 0.002;
- ^g p = 0.005;
- ^h p = 0.03;
- ⁱ p < 0.0001;
- ^j p = 0.01;
- ^k p = 0.02.

2014; Gomes et al., 2017; Adams et al., 2014; Imai et al., 2018), the present study provides a more complete evaluation, encompassing different DNA extraction techniques and different molecular diagnosis platforms, including an isothermal amplification method (LAMP) that is still rarely used for CL and MCL diagnosis.

Our data indicate that the DB method provided an average DNA concentration higher than that of the commercial kit, while the spin-column-based method, being the reference method, produced better quality genomic DNA. The cost of the DB method was 39 times lower than extraction by commercial kit. The DNA extraction method of choice should be simple, easy to perform, and cost-effective (Mimori et al., 2002). DNA losses and inadequate purity due to extraction procedures contribute to a reduction in overall detection assay performance (Landis and Koch, 1977; Queipo-Ortuño et al., 2008; Arbeli and Fuentes, 2007).

The accuracy of absorbance-based DNA concentration measurements by ultraviolet spectroscopy is dependent on the purity of the sample (Rothrock, 2011; De Mey et al., 2006). The worst DB performance may be related to the presence of residues of the Triton X-100 nonionic detergent (Dixit et al., 2018). Furthermore, swab samples extracted by the DB method showed a higher DNA degradation rate (94.5%) in comparison to the commercial kit. DNA fragmentation may also be related to the high temperature at which samples were submitted (Bit-skinashvili et al., 2019).

The kDNA-cPCR test was chosen as the reference test in the present study as it is one of the most evaluated molecular targets in the diagnosis of TL (Burza et al., 2018). However, the tests currently available for TL diagnosis do not provide enough accuracy to be considered the gold standard. In the absence of a gold standard diagnostic test, clinicians need to be aware of this limitation and assess the need to use other tests

before prescribing toxic drugs to patients (Pineiro et al., 2020).

The diagnostic tools for TL should ideally be accurate and easily deliverable to end-users (Kurizky et al., 2018). Currently, it is regarded that an adequate diagnostic test must meet the following criteria: real-time connectivity; easy non-invasive sample collection; as well as affordable, sensitive, specific, user-friendly, quick, equipment-free, and administrable (Land et al., 2019). In this study, the use of a swab, coupled with extraction via a spin-column-based method for TL diagnosis (for both CL and MCL), showed high performance, with the exception of SSU rRNA TaqMan™ RT-PCR. The high performance of swab samples can be explained by the fact that *Leishmania* amastigotes are mainly present in the upper layer of the dermis (Taslami et al., 2017). The superior performance of the molecular techniques associated with a swab in the CL form, as compared to the MCL, can be justified by exacerbated inflammatory reaction in mucosal lesions, which results in a low load of detectable parasites on the surface of the dermis (Boggild et al., 2011).

The TL swab samples, when evaluated by the kDNA-cPCR method, presented excellent results. The kDNA-cPCR coupled with a swab extracted by commercial kit showed the highest accuracy (95.6%) for TL diagnosis. For cotton swabbing of CL patients, the sensitivity was 94.4% for both extraction methods — the commercial kit and DB method. For MCL patients, diagnosis based on cotton swab presented a sensitivity of 90.5% when the extraction was performed by the commercial kit, and 71.4% when performed by the DB method.

The diagnostic performance of swab sampling was consistent with previous studies regarding non-invasive sample collection for TL molecular diagnosis. Other authors have found a sensitivity in swab sampling ranging from 41% to 98% according to the chosen molecular test

(Boggild et al., 2011; Gomes et al., 2014; Boni et al., 2017; Gomes et al., 2017; Adams et al., 2014). The first swab collection test for TL diagnosis was performed by Mimori et al., using cPCR diagnosis, and presented a 93.8% sensitivity (Mimori et al., 2002). In a study conducted in Colombia, the authors reported 98% sensitivity and 84% specificity in swab samples analyzed by qPCR in CL diagnosis (Adams et al., 2014). In Brazil, two previous studies have shown that, for the diagnosis of TL, the results of the PCR showed comparable diagnostic accuracy between swab sampling and biopsy sampling (Gomes et al., 2014; Boni et al., 2017; Gomes et al., 2017).

The kDNA-cPCR test was more sensitive than kDNA SYBR™ RT-PCR in detecting MCL cases, although no statistically significant difference was observed. The kinetoplast sequence is the most used target to design primers for the diagnosis of leishmaniasis. There is a multiplicity of primers for kDNA targets, with important differences in clinical sensitivity (Conter et al., 2019). However, in the present study, the primers used in conventional PCR and real-time PCR tests were the same. Differences in protocols may have influenced these results: i) concentration of primers, 0.6 μM in cPCR and 0.4 μM in RT-PCR; ii) 34 cycles in cPCR and 30 cycles in RT-PCR. These changes were made to avoid loss of specificity, since other primers targeting kDNA of *Leishmania* cross-reacted with DNA of *Trypanosoma cruzi* and *Mycobacterium tuberculosis* (Leon et al., 2017). The worst sensitivity was found in swab samples extracted by the DB method and analyzed by the SSU rRNA TaqMan™ RT-PCR test (47.2% for CL and 33.3% for ML). Only one previous study has reported a comparative evaluation of the molecular diagnosis of TL in swab samples extracted by commercial kit (97.5%) or by boil-spin method (61.3%) when analyzed by TaqMan™ qPCR (Adams et al., 2014) ..

The use of a cotton swab for sample collection associated with LAMP has the potential to overcome the limitations of poor-resourced settings for the diagnosis of CL and MCL (Notomi, 2000). In the present study, the sensitivity of the LAMP-RT 18S method in swab samples extracted with a commercial kit (82.5%) was close to that found in biopsy samples (86%) for TL diagnosis. In the previous study that developed this LAMP protocol, the authors reported a 98% sensitivity in CL biopsy samples from Suriname (Adams et al., 2010). Although the performance of this technique in swab samples extracted by DB has been lower (59.7%), its use can help to clarify suspected cases of TL, mainly in the mucous forms in resource-limited settings. In Japan, two cases of CL imported from Syria and Venezuela were clarified using Direct boil-LAMP method (Imai et al., 2018). Regarding the DB LAMP-RT 18S assay, its sensitivity may be compromised by the presence of impurities that may inhibit the activity of reverse transcriptase enzyme. New studies evaluating other LAMP assays without reverse transcriptase should be tested.

No statistical difference was observed in the Ct value analysis obtained from the swab samples extracted using either the DB method or the commercial kit ($t = -1.6$; $p = 0.11$). Other authors have found similar results when evaluating the parasite load in swab samples extracted by one commercial kit (Qiagen) and the “Boil-Spin” method (Adams et al., 2014).

5. Conclusion

The DNA samples collected by swab and extracted by the spin-column-based method showed better diagnostic performance in all molecular tests when compared to the DB method. The use of the swab as a non-invasive sampling method instead of a biopsy, associated with an efficient genomic DNA extraction protocol, may represent a high accuracy alternative for the molecular diagnosis of TL. The DB technique for DNA extraction from the material obtained by swab can be used preferably in association with the kDNA-cPCR. The DB LAMP-RT 18S assay has the potential to be used in the diagnosis of CL and MCL in resource-limited settings, as long as health professionals have been properly trained to perform the procedure and are concerned about the limitation of a negative result.

Appendix a. supplementary data

Supplementary data available.

Authors' contribution

VCSF, DUG and DMA: conceptualization, methodology, statistical analysis, writing. VCSF, CSAS, ARCS, PHB and JWS: experimental analysis, data gathering and writing. GFC: writing and statistical analysis.

Financial support

This study was supported by The National Council of Technological and Scientific Development (CNPq - 420,204/2016-4) and The Research Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG - APQ-03,237-16). VCSF would also like to thank CNPq-Brazil for its scholarship grant.

Ethical standards

The Ethical Research Committee of the Research Center René Rachou/FIOCRUZ and the Federal University of Minas Gerais approved this study (FIOCRUZ/CAAE: 44,545,315.7.0000.5091 and UFMG/CAAE: 32,343,114.9.0000.5149). All individuals participated voluntarily in the study and informed consent was obtained from each participant or from their legal guardian for underage participants.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Leishmaniasis Reference Center (LRC-FIOCRUZ/MG) and Otorhinolaryngology Division in the São Geraldo Annex of the Hospital das Clínicas (UFMG/MG).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.actatropica.2021.106275.

References

- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., et al., 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE* 7.
- Pan American Health Organization, 2019. Leishmaniasis Epidemiological Report of the Americas. Pan American Health Organization/World Health Organization. Report No. 8.
- Boggild, A.K., Valencia, B.M., Veland, N., Ramos, A.P., Calderon, F., Arevalo, J., et al., 2011. Non-invasive cytology brush PCR diagnostic testing in mucosal leishmaniasis: superior performance to conventional biopsy with histopathology. *PLoS ONE* 6 (10), e26395.
- Gomes, C.M., de Paula, N.A., Cesetti, M.V., Roselino, A.M., Sampaio, R.N.R., C.M. G., et al., 2014. Mucocutaneous leishmaniasis: accuracy and molecular validation of noninvasive procedures in a *L. (V.) braziliensis*-endemic area. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 79 (4), 413–418 [cited 2020 Jan 4]Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L53184952>.
- Queipo-Ortuño, M.I., Tena, F., Colmenero, J.D., Morata, P., 2008. Comparison of seven commercial DNA extraction kits for the recovery of Brucella DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27 (2), 109–114.
- Reithinger, R., Dujardin, J.C., 2007. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J. Clin. Microbiol.* 45 (1), 21–25.
- Boni, S.M., Oyafuso, L.K., Soler R de, C., Lindoso, J.A.L., 2017. Efficiency of noninvasive sampling methods (swab) together with Polymerase Chain Reaction (PCR) for diagnosing american tegumentary leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 59, e38.
- Dixit, K.K., Verma, S., Singh, O.P., Singh, D., Singh, A.P., Gupta, R., Negi, N.S., Das, P., Sundar, S., Singh, R., Salotra, P., 2018. Validation of SYBR green I based closed tube loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay and simplified direct-blood-

- lysis (DBL)-LAMP assay for diagnosis of visceral leishmaniasis (VL). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12 (11), e0006922 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006922>.
- Flahault, A., Cadilhac, M., Thomas, G., 2005. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. *J. Clin. Epidemiol.* 58 (8), 859–862. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2004.12.009>. PMID: 16018921.
- Gomes, C.M., Cesetti, M.V., De Paula, N.A., Vernal, S., Gupta, G., Sampaio, R.N.R., et al., 2017. Field validation of SYBR Green- and TaqMan-based real-time PCR using biopsy and swab samples to diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an area where *Leishmania (Vianna) brasiliensis* is endemic. *J. Clin. Microbiol.* 55 (2), 526–534.
- Adams, E.R., Schoone, G., Versteeg, I., Gomez, M.A., Diro, E., Mori, Y., et al., 2018. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 56 (7), e00318–e00386 [cited 2019 Sep 9] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29695527>.
- Adams, E.R., Gomez, M.A., Scheske, L., Rios, R., Marquez, R., Cossio, A., et al., 2014. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. *Parasitology* 141 (14), 1891–1897.
- Sevilha-Santos, L., Dos Santos Júnior, A.C.M., Medeiros-Silva, V., Bergmann, J.O., da Silva, E.F., Segato, L.F., et al., 2019. Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Infect.* 25 (2), 242–247 [cited 2020 Jan 10] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29730222>.
- Tan, S.C., Yiap, B.C., 2009. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J. Biomed. Biotechnol.* 2009, 1–10.
- da Silva, M.A.L., Medeiros, Z., Soares, C.R.P., da Silva, E.D., DB, Miranda-Filho, de Melo, F.L., 2014. A comparison of four DNA extraction protocols for the analysis of urine from patients with visceral leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47 (2), 193–197. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0233-2013> [cited 2021 Feb 24] Available from.
- Luz, ZMPZMP, Silva, A.R., da, Silva F de, O., Caligiorne, R.B., Oliveira, E., Rabello, A., 2009. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104 (1), 62–66 [cited 2019 Sep 30] Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762009000100010&lng=en&tlng=en.
- Mabey, D., Peeling, R.W., Ustianowski, A., Perkins, M.D., 2004. Diagnostics for the developing world. *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (3), 231–240.
- Bezerra, J.M.T., de Araújo, V.E.M., Barbosa, D.S., Martins-Melo, F.R., Werneck, G.L., Carneiro, M., 2018. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990–2016: findings from Global Burden of Disease Study 2016. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12 (9), e0006697 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006697>.
- Goto, H., Lindoso, J.A.L., 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 8 (4), 419–433 [cited 2019 Sep 3] Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=1358616545>.
- Imai, K., Tarumoto, N., Amo, K., Takahashi, M., Sakamoto, N., Kosaka, A., et al., 2018. Non-invasive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by the direct boil loop-mediated isothermal amplification method and MinIONTM nanopore sequencing. *Parasitol. Int.* 67 (1), 34–37 [cited 2020 Jan 9] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28288843>.
- Mikita, K., Maeda, T., Yoshikawa, S., Ono, T., Miyahira, Y., Kawana, A., 2014. The Direct Boil-LAMP method: a simple and rapid diagnostic method for cutaneous leishmaniasis. *Parasitol. Int.* 63 (6), 785–789.
- De Mey, M., Lequeux, G., Maertens, J., De Maesseneire, S., Soetaert, W., Vandamme, E., 2006. Comparison of DNA and RNA quantification methods suitable for parameter estimation in metabolic modeling of microorganisms. *Anal. Biochem.* 353 (2), 198–203.
- Disch, J., Maciel, F.C., de Oliveira, M.C., Orsini, M., Rabello, A., 2003. Detection of circulating leishmania chagasi DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97 (4), 391–395.
- Sriwiranat, C., Phumee, A., Mungthin, M., Leelayoova, S., Siriysatien, P., 2015. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for simple detection of *Leishmania* infection. *Parasites Vectors* 8 (1).
- Mimori, T., Matsumoto, T., Calvopiña, M.H., Gomez, E.A., Saya, H., Katakura, K., et al., 2002. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Acta Trop.* 81 (3), 197–202.
- Adams, E.R., Schoone, G.J., Aged, A.F., El, Saif, S., Schallig, H.D.F.H., 2010. Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Leishmania* parasites in clinical samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82 (4), 591–596 [cited 2019 Sep 9] Available from: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2010.09-0369>.
- Burza, S., Croft, S.L., Boelaert, M., 2018. Leishmaniasis. *Lancet* 392 (10151), 951–970 [cited 2021 Feb 24] Available from <https://doi.org/10.1016/>.
- Paulos, S., Mateo, M., de Lucio, A., Hernández-de Mingo, M., Bailo, B., Saugar, J.M., et al., 2016. Evaluation of five commercial methods for the extraction and purification of DNA from human faecal samples for downstream molecular detection of the enteric protozoan parasites *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba* spp. *J. Microbiol. Methods* 127, 68–73.
- Verma, S., Singh, R., Sharma, V., Bumb, R.A., Negi, N.S., Ramesh, V., et al., 2017. Development of a rapid loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis and assessment of cure of *Leishmania* infection. *BMC Infect. Dis.* 17 (1).
- Wortmann, G., Sweeney, C., Houg, H.S., Aronson, N., Stiteler, J., Jackson, J., et al., 2001. Rapid diagnosis of Leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65 (5), 583–587.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics* 33, 363–374.
- Notomi, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28 (12), 63e–663 [cited 2020 Jan 4] Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/28.12.e63>.
- Nzelu, C.O., Cáceres, A.G., Guerrero-Quincho, S., Tineo-Villafuerte, E., Rodríguez-Delfín, L., Mimori, T., et al., 2016. A rapid molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis by colorimetric malachite green-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with an FTA card as a direct sampling tool. *Acta Trop.* 153, 116–119.
- Arbeli, Z., Fuentes, C.L., 2007. Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples. *FEMS Microbiol. Lett.* 272 (2), 269–275.
- Rothrock, M.J., 2011. Comparison of microvolume DNA quantification methods for use with volume-sensitive environmental DNA extracts. *J. Nat. Environ. Sci.* 2, 34–38.
- Biswas, B., 2016. Clinical performance evaluation of molecular diagnostic tests. *J. Mol. Diagnostics* 18 (6), 803–812.
- Bitskinashvili, K., Gabriadze, I., Kutateladze, T., Vishnepolsky, B., Mikeladze, D., Datukishvili, N., 2019. Influence of heat processing on DNA degradation and PCR-based detection of wild-type and transgenic maize. *J. Food Qual.* 5677640.
- Pinheiro, A.B.S., Kurizky, P.S., Ferreira, M.F., et al., 2020. The accuracy of the Montenegro skin test for leishmaniasis in PCR-negative patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 53, e20190433.
- Kurizky, P.S., da, Mota LMH, Gomes, C.M., P.S, K., L.M.H.D, M., C.M, G., 2018. The paradox of tegumentary leishmaniasis diagnosis: how the need for accurate and modern techniques is being addressed in low income areas. *EBioMedicine.* 38, 19–20. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.10.063> [cited 2021 Feb 24] Available from.
- Land, K.J., Boeras, D.I., Chen, X.S., Ramsay, A.R., Peeling, R.W., 2019. REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. *Nat. Microbiol.* 4 (1), 46–54.
- Taslimi, Y., Sadeghipour, P., Habibzadeh, S., Mashayekhi, V., Mortazavi, H., Müller, L., et al., 2017. A novel non-invasive diagnostic sampling technique for cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (7).
- Chagas, U.M.R., Avelar, D.M., Marcelino, A.P., Paz, G.F., Gontijo, C.M.F., 2021. Correlations between tissue parasite load and common clinical signs in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* 29, 109368.
- Chaouch, M., Aoun, K., Ben Orhman, S., Ben Abid, M., Ben Shaiar, I., Bouratbine, A., et al., 2019. Development and assessment of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* specific loop-mediated isothermal amplification assays for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 101 (1), 101–107.
- Chowdhury, R., Ghosh, P., Khan, M.A.A., Hossain, F., Faizal, K., Nath, R., et al., 2020. Evaluation of rapid extraction methods coupled with a recombinase polymerase amplification assay for Point-of-need diagnosis of Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Trop Med Infect Dis* 5 (2), 95 [cited 2021 Feb 24] Available from: <https://doi.org/10.1093/tmid/taaa017>.
- Conter, C.C., Mota, C.A., dos Santos, B.A., Braga, L.S., Terron, M.S., Novasconi, T.R., et al., 2019. PCR primers designed for new world *Leishmania*: a systematic review. *Exp. Parasitol.* 207, 107773.
- León, C.M., Muñoz, M., Hernández, C., et al., 2017. Analytical performance of four polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR (qPCR) assays for the detection of six *Leishmania* species DNA in Colombia. *Front. Microbiol.* 8, 1907.

7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados desse estudo indicaram que o uso de *swab* como método minimamente invasivo na coleta das amostras pode ser uma alternativa de baixo custo a ser aplicado na prática médica para o diagnóstico molecular da LT. As técnicas moleculares mostraram melhor desempenho quando associadas ao DNA extraído pelo kit comercial. Para a LC, o uso do *swab* associado à extração por kit comercial apresentou elevado desempenho independente da técnica molecular utilizada; enquanto para a LM esta associação apresentou melhor sensibilidade na cPCR kDNA. A utilização da técnica DB para extração de *swabs* requer atenção, pois a sensibilidade das técnicas moleculares avaliadas apresentou grande variação.

Considerando os resultados encontrados, tem-se como perspectiva a realização de um estudo de acurácia diagnóstica de LC e LM com o uso do *swab* e os diferentes métodos de extração associados às técnicas moleculares em um maior grupo amostral, além de avaliação de custo-efetividade das novas alternativas.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico da LT é ainda um desafio de saúde pública no Brasil. Atualmente, o diagnóstico é baseado em critérios clínico-epidemiológicos e exames laboratoriais essencialmente parasitológicos. Além disso, a coleta das amostras é realizada de modo invasivo, através de escarificação ou biópsia da lesão. Alternativas diagnósticas acuradas, acessíveis e menos invasivas são necessárias.

O uso de *swab* como método de coleta minimamente invasivo para o diagnóstico de LT associado a um protocolo eficiente de extração de DNA genômico, pode ser uma alternativa tão eficiente quanto à biópsia para a obtenção de amostra a ser utilizada no diagnóstico molecular. Além disso, a coleta por *swab* pode facilitar o diagnóstico nas áreas remotas, onde os recursos médicos e laboratoriais são limitados. Em cenários com recursos escassos, a técnica DB para extração de *swab* pode ser utilizada preferencialmente associada com o cPCR kDNA, desde que os profissionais de saúde estejam atentos às limitações dessa técnica de extração, principalmente quando os testes moleculares apresentarem resultados negativos.

|

REFERÊNCIAS

- ADAMS, E. R. et al. Development of a Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Sensitive Detection of Leishmania Parasites in Clinical Samples. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 4, p. 591–596, 2010.
- ADAMS, E. R. et al. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. **Parasitology**, v. 141, n. 14, p. 1891–1897, 2014.
- ADAMS, E. R. et al. Development and Evaluation of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 7, p. e00386-18, 2018.
- ADAUI, V. et al. Association of the endobiont double-stranded RNA virus LRV1 with treatment failure for human leishmaniasis caused by leishmania braziliensis in Peru and Bolivia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 1, p. 112–121, 2016.
- AKUFFO, H. et al. New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 5, p. e0006375, 2018.
- ALONSO, A. et al. Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in forensic and ancient DNA studies. **Croatian Medical Journal**, v. 44, n. 3, p. 273–280, 2003.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 35671, 2012.
- ALVES-FERREIRA, E. V. C. et al. Differential Gene Expression and Infection Profiles of Cutaneous and Mucosal Leishmania braziliensis Isolates from the Same Patient. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–19, 2015.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1269–1281, 2000.
- AVELAR, D. M. DE; CARVALHO, D. M.; RABELLO, A. Development and Clinical Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1–7, 2019.
- AZEREDO-COUTINHO, R. B. G. et al. Intestinal helminth coinfection is associated with mucosal lesions and poor response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 154, p. 42–49, 2016.
- BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, dez. 2002.

BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* Produces a Wide Spectrum of Clinical Disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 536–546, 1991.

BARRAL, A. et al. Biological Behavior of *Leishmania amazonensis* Isolated from Humans with Cutaneous, Mucosal, or Visceral Leishmaniasis in Balb/C Mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, n. 2, p. 178–184, 1996.

BENSOUSSAN, E. et al. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1435–1439, 2006.

BERENSMEIER, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 3, p. 495–504, 2006.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 10, p. e313, 2008.

BOGGILD, A. K. et al. Detection and Species Identification of *Leishmania* DNA from Filter Paper Lesion Impressions for Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 1, p. e1–e6, 2010.

BOGGILD, A. K. et al. Non-invasive cytology brush pcr diagnostic testing in mucosal leishmaniasis: Superior performance to conventional biopsy with histopathology. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e26395, 2011.

BONI, S. M. et al. Efficiency of noninvasive sampling methods (swab) together with Polymerase Chain Reaction (PCR) for diagnosing american tegumentary leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 59, p. e38, 2017.

BORST, P.; HOEIJMAKERS, J. H. J. Kinetoplast DNA. **Plasmid**, v. 2, n. 1, p. 20–40, 1979.

BRACHO, C. O. et al. Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis' diagnosis: A validation study. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 549–554, 2007.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 5, p. 488–494, 1999.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar**. 1^a ed. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2017.

BRASIL. **Sistema de informação sobre mortalidade**. Disponível em:

<<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203r.def>>. Acesso em: 22 dez. 2019a.

BRASIL. Guia de Vigilância em Saúde. 3^a ed. Brasília: Ministério da Saúde do Brasil - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2019b.

BRAZ, L. M. A. Tegumentary leishmaniasis diagnosis: What happened with MST (Montenegro skin test) in Brazil? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 61, n. 0, p. 1–3, 2019.

BRAZIL, R. P.; RODRIGUES, A. A. F.; ANDRADE-FILHO, J. D. Sand Fly Vectors of Leishmania in the Americas - A Mini Review. **Entomology, Ornithology & Herpetology: Current Research**, v. 4, n. 2, p. 144, 2015.

CANTANHÊDE, L. M. et al. Further Evidence of an Association between the Presence of Leishmania RNA Virus 1 and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, 2015.

CARVALHO, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 56, n. 4, p. 315–25, 1994.

CARVALHO, L. P.; PASSOS, S. T.; JESUS, A. R. Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 1, n. 139, p. 57–65, 2005.

CELESTE, J. L. DE L. et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Leishmania amazonensis in skin samples. **Experimental Parasitology**, v. 203, p. 23–29, 2019.

CERVANTES-LANDÍN, A. Y. et al. Estandarización de la técnica Dot-ELISA para la detección de anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi y su comparación con ELISA y Western blot. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 32, n. 6, p. 363–368, 2014.

CINCINNATI, T. D. P.; CINCINNATI, X. D. **Stable reagents and kits useful in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) - US20080182312A1**, 2008. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US20080182312A1/en?q=US20080182312>>. Acesso em: 10 jan. 2020

CINCURÁ, C. et al. Mucosal leishmaniasis: A retrospective study of 327 cases from an endemic area of Leishmania (Viannia) braziliensis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 761–766, 2017.

COELHO, E. A. F. et al. Evaluation of two recombinant Leishmania proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 215, p. 63–71,

2016.

CONTER, C. C. et al. PCR primers designed for new world Leishmania: A systematic review. **Experimental Parasitology**, v. 207, 2019.

CONVIT, J.; KERDEL-VEGAS, F.; GORDON, B. Disseminated anergic cutaneous leishmaniasis. **The British journal of dermatology**, v. 74, p. 132–5, 1962.

CONVIT, J.; PINARDI, M. E.; RONDÓN, A. J. Diffuse cutaneous leishmaniasis: A disease due to an immunological defect of the host. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 4, p. 603–610, 1972.

CORIS BIOCONCEPT. **Leishmania OligoC-Test** (S. P. Crealys, Ed.). Gembloux: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.corisbio.com/pdf/Products/Coris-Leishmania-OligoC-Test-Diagnostic.pdf>>. Acesso em: 4 jan. 2020.

COSTA, J. M. L. et al. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 3, p. 16–24, 2009.

COTA, G. F. et al. The Cure Rate after Placebo or No Therapy in American Cutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0149697, 2016.

CUPOLILLO, E. et al. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of Leishmania. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 73, n. 1–2, p. 145–155, 1995.

DA-CRUZ, A. M. et al. Atypical Mucocutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in an Acquired Immunodeficiency Syndrome Patient: T-cell Responses and Remission of Lesions Associated with Antigen Immunotherapy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 4, p. 537–542, 1999.

DAHM, R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. **Developmental Biology**, v. 278, n. 2, p. 274–288, 2005.

DE BRUIJN, M. H.; BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta tropica**, v. 52, n. 1, p. 45–58, 1992.

DE MELLO, C. X. et al. Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology Research**, v. 109, n. 3, p. 927–933, 2011.

DE PAIVA CAVALCANTI, M. et al. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. **Molecular and Cellular Probes**, v. 27, n. 3–4, p. 122–128, 2013.

DEBORGGRAEVE, S. et al. A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 198, n. 10, p. 1565–72, 2008.

DEGRAVE, W. et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* using the polymerase chain reaction. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 367–8, 1994.

DENG, M. H. et al. Detection of helminths by loop-mediated isothermal amplification assay: A review of updated technology and future outlook. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 8, n. 1, p. 1–22, 2019.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DINIZ, J. L.; COSTA, M.; GONÇALVES, D. Mucocutaneous Leishmaniasis: clinical markers in presumptive diagnosis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology** on **September**, v. 77, n. 3, p. 380–384, 2011.

DISCH, J. et al. *Leishmania* (*Viannia*) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 51, n. 3, p. 185–190, 2005.

ESPINOSA, D. et al. *Leishmania* OligoC-TesT as a simple, rapid, and standardized tool for molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Peru. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2560–2563, 2009.

FAGUNDES, A. et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 1, p. 109–12, 2010.

FARIA, D. R. et al. Decreased In Situ Expression of Interleukin-10 Receptor Is Correlated with the Exacerbated Inflammatory and Cytotoxic Responses Observed in Mucosal Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 7853–7859, 2005.

GARCIA, A. L. et al. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 4, p. 368–371, 2007.

GARCÍA BUSTOS, M. F. et al. Clinical and epidemiological features of leishmaniasis in northwestern-Argentina through a retrospective analysis of recent cases. **Acta Tropica**, v. 154, p. 125–132, 2016.

GOMES, C. M. et al. Mucocutaneous leishmaniasis: Accuracy and molecular validation of noninvasive procedures in a *L. (V.) braziliensis*-endemic area. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 4, p. 413–418, 2014.

GOMES, C. M. et al. Field validation of SYBR Green- and TaqMan-based real-time PCR using biopsy and swab samples to Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an Area Where Leishmania (Viannia) braziliensis is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 526–534, 2017.

GONÇALVES, L. F. C. T. **Validação do diagnóstico molecular da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar na rotina diagnóstica de um laboratório de saúde pública, São Paulo, Brasil**. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2018.

GONZÁLEZ, U. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 15, n. 2, p. 1–152, 2009.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293–307, 2012.

GRAÇA, G. C. DA et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 664–674, 2012.

GRYBCHUK, D. et al. RNA viruses in trypanosomatid parasites: A historical overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 4, 2018.

GUERRA, J. A. DE O. et al. Mucosal Leishmaniasis Caused by Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Viannia) guyanensis in the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. e980, 2011.

GUILBRIDE, L.; MYLER, P. J.; STUART, K. Distribution and sequence divergence of LRV1 viruses among different Leishmania species. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 54, n. 1, p. 101–104, 1992.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911–926, 2015.

HARTLEY, M. A. et al. Leishmania RNA virus: when the host pays the toll. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 99, 2012.

HEID, C. et al. Real time quantitative PCR. **Experimental & molecular medicine**, v. 33, n. 1 Suppl, p. 101–109, 1996.

IMAI, K. et al. Non-invasive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by the direct boil

loop-mediated isothermal amplification method and MinION™ nanopore sequencing. **Parasitology international**, v. 67, n. 1, p. 34–37, 2018.

INBIOS INTERNATIONAL, I. **CL Detect™ Rapid Test for Cutaneous Leishmaniasis (INTL)**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://inbios.com/cl-detecttm-rapid-test-for-cutaneous-leishmaniasis-intl/>>. Acesso em: 4 jan. 2020.

ISAZA', D. M. et al. Diagnosis Validation of the polymerase chain reaction for the diagnosis of human cutaneous leishmaniasis in north-west Colombia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 165–168, 2002.

IVES, A. et al. Leishmania RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. **Science**, v. 331, n. 6018, p. 775–778, 2011.

JARA, M. et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of Leishmania (Viannia) organisms in skin and mucosal lesions: Exploratory study of parasite load and clinical parameters. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1826–1833, 2013.

JOHN, S. W. M. et al. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 2, p. 408, 1991.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, 2006.

KUMAR et al. **Basic Pathology**. 8^a ed. India: Elsevier, 2007.

LAHIRI, D. K.; NUMBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LAINSON, R. et al. Leishmaniasis in brazil: XIII. Isolation of leishmania from armadillos (*dasybus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north para' state. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 239–242, 1979.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmania (*Viannia*) *naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasybus novemcinctus* (L.) in Amazonian brazil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 64, n. 1, p. 3–9, 1989.

LAND, K. J. et al. REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 46–54, 2019.

LEÓN, C. M. et al. Analytical performance of a loop-mediated isothermal amplification assay for leishmania DNA detection in sandflies and direct smears of patients with cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 5, p. 1325–1331, 2018.

LIMA, M. I. S. et al. Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime®. **Archives of Toxicology**, v. 84, n. 3, p. 227–232, 2010.

LINDOSO, J. A. L. et al. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. **British Journal of Dermatology**, v. 160, n. 2, p. 311–318, 2009.

LONDON, N. A. A.; ALBANS, D. L. S. **Recombinase polymerase amplification - US7270981B2**, 2007. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US7270981B2/en?q=US7270981>>. Acesso em: 10 jan. 2020

LYRA, M. R. et al. Primeiro relato da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em uma área urbana do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 57, n. 5, p. 451–454, 2015.

MABEY, D. et al. Diagnostics for the developing world. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 231–240, 2004.

MACEDO, D. H. et al. Low frequency of LRV1 in *Leishmania braziliensis* strains isolated from typical and atypical lesions in the State of Minas Gerais, Brazil. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 210, n. 1–2, p. 50–54, 2016.

MACHADO-COELHO, G. L. L. et al. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 1, p. 55–61, 2005.

MACHADO, E. S. et al. Disseminated American muco-cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis* in a patient with AIDS: a case report. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 4, p. 487–92, 1992.

MACHADO, P. R. et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 8, p. 438–444, 2011.

MAGALHÃES, A. V. et al. 4. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*: 4. Classificação histopatológica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 6, p. 421–430, 1986.

MARCO, J. D. et al. Polymorphism-specific PCR enhances the diagnostic performance of American tegumentary leishmaniasis and allows the rapid

identification of Leishmania species from Argentina. **BMC infectious diseases**, v. 12, p. 191, 15 ago. 2012.

MARDAN-NIK, M. et al. A method for improving the efficiency of DNA extraction from clotted blood samples. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 33, n. 6, 2019.

MARTÍNEZ, D. Y. et al. Tegumentary leishmaniasis and coinfections other than HIV. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. e0006125, 2018.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. **Jornal brasileiro de medicina**, v. 63, n. 5/6, 1992.

MATHERS, C. D.; EZZATI, M.; LOPEZ, A. D. Measuring the burden of neglected tropical diseases: The global burden of disease framework. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, n. 2, 2007.

MIKITA, K. et al. The Direct Boil-LAMP method: A simple and rapid diagnostic method for cutaneous leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 63, n. 6, p. 785–789, 2014.

MIRANDA, A. et al. Evaluation of PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis and species identification using filter paper samples in Panama, Central America. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 9, p. 544–548, 2012.

MITANI, Y. et al. **Process for amplifying nucleic acid - US7803579B2** -, 2010.
Disponível em:
<<https://patents.google.com/patent/US7803579B2/en?q=US7803579B2>>. Acesso em: 10 jan. 2020

MONTALVO, A. M. et al. Detection and identification of Leishmania spp.: application of two hsp70-based PCR-RFLP protocols to clinical samples from the New World. **Parasitology Research**, v. 116, n. 7, p. 1843–1848, 2017.

MONTENEGRO, J. CUTANEOUS REACTION IN LEISHMANIASIS. **Archives of Dermatology**, v. 13, n. 2, p. 187, 1926.

MORI, Y.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 26, n. 1, p. 13–17, 2019.

NAIFF, R. D.; TALHARI, S.; BARRETT, T. V. Isolation of leishmania guyanensis from lesions of the nasal mucosa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 4, p. 529–530, 1988.

NASIRI, H. et al. Modified salting-out method: High-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. **Journal of Clinical Laboratory**

Analysis, v. 19, n. 6, p. 229–232, 2005.

NEITZKE-ABREU, H. C. et al. Detection of DNA from *Leishmania* (Viannia): Accuracy of Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e62473, 2013.

NICKLAS, J. A.; BUEL, E. Development of an Alu-based, Real-Time PCR Method for Quantitation of Human DNA in Forensic Samples. **Journal of Forensic Sciences**, v. 48, n. 5, p. 2002414, 2003.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, p. 63e – 63, 2000.

NZELU, C. O.; KATO, H.; PETERS, N. C. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of *Leishmania* infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 11, p. e0007698, 2019.

OLIVEIRA, D. S. DE. **Aplicabilidade de testes sorológicos para diagnóstico da forma mucosa da leishmaniose tegumentar**. Belo Horizonte: Instituto René Rachou, 2018.

OLIVEIRA, J. G. S. et al. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 94, n. 1, p. 55–59, 2005.

OSIRO BERGMANN, J. et al. Accuracy of a TaqMan-based real-time polymerase chain reaction combined to a *Novy-MacNeal-Nicolle* medium culture for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 33, n. 5, p. e188–e190, maio 2019.

PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Epidemiological Report of the Americas: Leishmaniases 03/2019**. [s.l.] PAHO, 2019. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50505>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

PEREIRA, A. A. S. et al. Detection of *Leishmania* spp in silvatic mammals and isolation of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* from *Rattus rattus* in an endemic area for leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, 2017.

PEREIRA, L. DE O. R. et al. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with *Leishmania* RNA virus 1 infection in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 665–667, 2013.

PIEPENBURG, O. et al. DNA detection using recombination proteins. **PLoS biology**, v. 4, n. 7, p. e204, 2006.

RANGEL, E.; LAINSON, R. Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In: FIOCRUZ (Ed.). **Flebotomíneos do**

Brasil. 1^a ed. Rio de Janeiro, Brasil: 2003, 2003. p. 291–309.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

RIEMANN, K. et al. Comparison of manual and automated nucleic acid extraction from whole-blood samples. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 21, n. 4, p. 244–248, 2007.

RODGERS, M. et al. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. **Experimental Parasitology**, v. 71, p. 267–275, 1990.

RODRIGUES, E. H. G. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3572–6, 2002.

ROMERO, G. A. . et al. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania (Viannia) guyanensis. **Acta Tropica**, v. 79, n. 3, p. 225–229, 2001.

ROMERO, G. A. S. et al. Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005706, 2017.

ROTUREAU, B. et al. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world Leishmania species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 459–467, 2006.

RUAS, A. C. N. et al. Voice Disorders in Mucosal Leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e101831, 2014.

SAAD, A. A. et al. Diagnostic Accuracy of the Leishmania OligoC-TesT and NASBA-Oligochromatography for Diagnosis of Leishmaniasis in Sudan. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, p. e776, 2010.

SALDARRIAGA, O. A. et al. An Innovative Field-Applicable Molecular Test to Diagnose Cutaneous Leishmania Viannia spp. Infections. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004638, 2016.

SAMPAIO, R. N. R. et al. A randomized, open-label clinical trial comparing the long-term effects of miltefosine and meglumine antimoniate for mucosal leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. e20180292, 2019.

SANTELLA, R. M. Approaches to DNA/RNA extraction and whole genome amplification. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 15, n. 9, p. 1585–1587, 2006.

SCHALLIG, H. D. F. H. et al. Evaluation of point of care tests for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Suriname. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 25, 2019.

SCHIEBELHUT, L. M. et al. A comparison of DNA extraction methods for high-throughput DNA analyses. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, n. 4, p. 721–729, 2017.

SCOTT, P. Leishmania - A parasitized parasite. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 18, p. 1773–1774, 2011.

SEVILHA-SANTOS, L. et al. Accuracy of qPCR for quantifying Leishmania kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. **Clinical microbiology and infection**, v. 25, n. 2, p. 242–247, 2019.

SHAHBAZI, F. et al. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: A comparison with the parasitological methods. **Parasitology Research**, v. 103, n. 5, p. 1159–1162, 2008.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: X. some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 3, p. 323–335, 1975.

SHIRIAN, S. et al. Comparison of Conventional, Molecular, and Immunohistochemical Methods in Diagnosis of Typical and Atypical Cutaneous Leishmaniasis. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 138, n. 2, p. 235–240, 2014.

SILVEIRA, F. T. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 9, p. 505–516, 2019.

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 1135–1145, 1997.

SOUZA, C. S. A. DE. **Análise temporal, espacial e fatores associados à mortalidade por leishmaniose tegumentar no Brasil**. [s.l.] Instituto René Rachou, 2018.

SRIWORARAT, C. et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for simple detection of Leishmania infection. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, 2015.

TAN, S. C.; YIAP, B. C. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, p. 1–10, 2009.

- TARR, P. I. et al. LR1: A candidate RNA virus of Leishmania. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 24, p. 9572–9275, 1988.
- TASLIMI, Y. et al. A novel non-invasive diagnostic sampling technique for cutaneous leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, 2017.
- THOMAZ-SOCCOL, A. et al. Clinical aspects and relevance of molecular diagnosis in late mucocutaneous leishmaniasis patients in Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 3, p. 487–494, 2011.
- TSUKAYAMA, P. et al. A FRET-Based Real-Time PCR Assay to Identify the Main Causal Agents of New World Tegumentary Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, 2013.
- TURETZ, M. L. et al. Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 12, p. 1829–1834, 2002.
- VAN EYS, G. J. J. M. et al. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of Leishmania parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 51, n. 1, p. 133–142, 1992.
- VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 97–101, 2003.
- VELAND, N. et al. Polymerase chain reaction detection of leishmania kDNA from the urine of Peruvian patients with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 4, p. 556–561, 2011.
- VENAZZI, E. et al. Detection of Leishmania (Viannia) DNA in blood from patients with American cutaneous leishmaniasis. **Experimental parasitology**, v. 115, n. 4, p. 399–402, 2007.
- VERGEL, C.; WALKER, J.; SARAVIA, N. G. Amplification of human DNA by primers targeted to Leishmania kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 4, p. 423–429, 2005.
- VOLPINI, A. C. et al. PCR-RFLP to identify Leishmania (Viannia) braziliensis and L. (Leishmania) amazonensis causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 90, n. 1, p. 31–7, 2004.
- VON STEBUT, E. Leishmaniasis. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 13, n. 3, p. 191–200, 2015.

WEIGLE, K. A. et al. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 601–606, 2002.

WEIRATHER, J. L. et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3892–3904, 2011.

WHO. **Control of the leishmaniasis**. Geneva: 2010, 2010. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 22 jan. 2020.

WHO. **Weekly epidemiological record - Global leishmaniasis update, 2006 - 2015: a turning point in leishmaniasis surveillance**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/>. Acesso em: 8 abr. 2019.

WIDMER, G. et al. Characterization of a RNA virus from the parasite *Leishmania*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 15, p. 5979–5982, 1989.

WOODARD, D. L.; HOWARD, A. J.; DOWN, J. A. **PROCESS FOR PURIFYING DNA ON HYDRATED SILCA - US5342931A**, 1993. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US5342931A/en>>. Acesso em: 21 jan. 2020

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 132, n. 1, p. 1–16, 2003.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO NO PROJETO: Desenvolvimento, avaliação e custo-efetividade da técnica “Loop-mediated isothermal amplification” para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana.

* O presente termo deverá ser emitido e assinado em duas vias. Todas as páginas deverão ser rubricadas

INFORMAÇÕES AO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL PELO PACIENTE

Você, _____, está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa que envolve a avaliação de diferentes testes diagnósticos para leishmaniose tegumentar e tem o direito de estar ciente dos procedimentos que serão realizados durante sua participação.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL. Dr. Daniel Moreira de Avelar, biólogo, doutor em Parasitologia, tecnologista do Centro de Referência em Leishmaniose - Centro de Pesquisas René Rachou - CPqRR, FIOCRUZ.

INFORMAÇÕES GERAIS. A leishmaniose tegumentar é uma doença causada por um microrganismo chamado *Leishmania* que é transmitido ao ser humano pela picada de um inseto chamado flebótomo. Esta doença causa lesões na pele e mucosas. Outras doenças podem ter sintomas parecidos e por isto os médicos precisam de exames de laboratório para confirmar a leishmaniose. O exame que dá mais certeza do diagnóstico é a procura da *Leishmania* em pequenos fragmentos retirados das lesões. Mas este exame pode ser desconfortável e nem sempre é possível encontrar a *Leishmania*, por isto são necessários outros exames. Nesta pesquisa três testes para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar serão avaliados: 1) Teste LAMP-LT kDNA, 2) Teste LAMP-RT 18S rRNA e 3) Reação em cadeia da polimerase (PCR).

OBJETIVO DA PEQUISA. Avaliar se os testes LAMP-LT kDNA, LAMP-RT 18S rRNA e PCR convencional vão dar resultados positivos nos pacientes com leishmaniose tegumentar e negativo em pacientes que tem doença parecida com leishmaniose tegumentar, mas de outras causas e comparar os resultados destes testes. Além disso, verificar o custo destes testes.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO. Os pacientes que procurarem o ambulatório do Centro de Referência em Leishmanioses – Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR-FIOCRUZ) serão convidados a participar deste estudo e se aceitarem, assinarão este Termo de Consentimento. Os pacientes serão submetidos à avaliação clínica completa e será realizada coleta de informações por meio de questionário. Serão coletados dados de identificação, história da doença atual e de doenças anteriores e apresentação clínica. Após avaliação clínica, serão coletadas amostras de fragmento de lesão (biópsia), aspirado de lesão e líquidos liberados naturalmente pela lesão dos pacientes com

suspeita de leishmaniose tegumentar. Também será realizado o teste de Montenegro, que consiste na aplicação de uma injeção no antebraço e que após 48 horas deverá ter sua leitura realizada, indicando resultado positivo ou negativo. O paciente deverá retornar ao ambulatório do CPqRR/FIOCRUZ para que os profissionais de saúde realizem a leitura desse teste. Todos os pacientes com leishmaniose tegumentar confirmada serão tratados a critério do médico assistente, de acordo com as recomendações para o tratamento da leishmaniose tegumentar atualmente vigentes no Brasil. Pacientes portadores de outras doenças serão tratados de acordo com orientações dos médicos assistentes.

BENEFÍCIOS. Sua participação neste trabalho não lhe trará benefício direto, além do que já lhe é assegurado pelo seu atendimento neste serviço e não trará benefício direto ao profissional de saúde.

RISCOS POTENCIAIS. Todos os procedimentos médicos a serem realizados já seriam feitos no caso dos sintomas que você apresenta. Pode ocorrer desconforto (dor local) na aplicação da injeção (teste de Montenegro) e coleta de fragmento da lesão (biópsia). Para realização da biópsia será utilizado anestésico. A coleta de líquidos liberados pela lesão com *swab* (cotonete laboratorial) é uma metodologia não invasiva que não traz riscos ao paciente.

Armazenamento de amostras biológicas para uso em pesquisas futuras

As amostras de fragmento de lesão (biópsia), aspirado de lesão e líquidos liberados pela lesão coletados com *swab* (cotonete laboratorial) serão utilizadas para confirmar o diagnóstico da leishmaniose tegumentar. Essas amostras serão guardadas no laboratório do Centro de Referência em Leishmanioses do CPqRR/FIOCRUZ. Existe a possibilidade de essas amostras serem utilizadas em novas pesquisas que precisem de amostras de pacientes com diagnóstico confirmado de leishmaniose tegumentar, principalmente para desenvolver novos métodos de diagnóstico que permitam facilitar o cuidado aos pacientes que sofrem com essa doença no Brasil e em outras partes do mundo. Nesse caso, você será procurado novamente e sua amostra só será utilizada em uma nova pesquisa se você concordar e assinar novo termo de consentimento livre e esclarecido.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DOS DADOS /CONFIDENCIALIDADE. Todas as informações da pesquisa serão sigilosas. Ninguém divulgará o nome dos participantes e os resultados dos exames identificados com o nome dos participantes, a não ser para os pais ou responsáveis, no caso dos menores de idade. Você não será identificado em qualquer relatório ou publicação que resulte deste estudo.

ENTENDIMENTO POR PARTE DOS PARTICIPANTES. Eu pude fazer perguntas relacionadas com todos os exames e objetivo da pesquisa e os pesquisadores estavam aptos a respondê-las. Autorizo, por este documento, ao Dr. Daniel Moreira de Avelar e sua equipe a me incluir neste projeto. Fui informado que posso retirar meu consentimento e interromper minha participação neste projeto a qualquer momento e que isto não impedirá que eu continue a receber a assistência necessária. Posso discutir as questões relacionadas com minha participação neste projeto, durante ou depois de sua realização, com Dr. Daniel Moreira de Avelar e/ou sua equipe, pelo telefone (31) 33497783 ou no

CPqRR, situado à Av. Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, Belo Horizonte. Também posso entrar em contato pelo telefone (31) 33497825 com o Comitê de Ética do Centro de Pesquisas René Rachou para obter informações sobre esse projeto, situado à Av. Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, Belo Horizonte. O Comitê de Ética é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos, garantindo os interesses e a segurança dos participantes. Estou ciente de que tenho o direito de obter informações sobre os resultados dessa pesquisa. Esse termo deverá ser emitido e assinado em duas vias, sendo que uma delas ficará comigo. Com base no exposto acima, dou meu consentimento para participar voluntariamente desta pesquisa.

Nome do participante

Nome do pesquisador

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador



Impressão do
dedo polegar caso
não saiba assinar.

Local e data: _____

ANEXO A – Aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

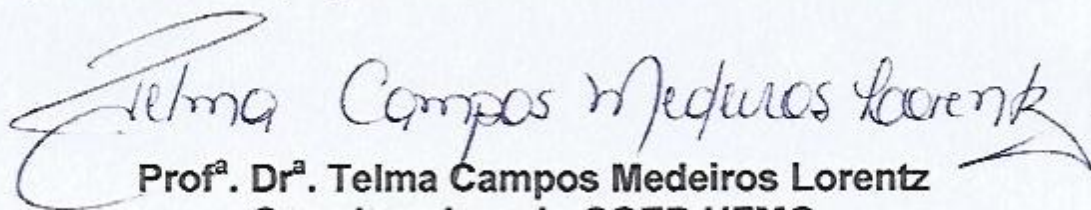
Projeto: CAAE – 32343114.9.0000.5149

**Interessado(a): Prof^a. Denise Utsch Gonçalves
Depto. de Oftalmologia e Otorrinolaringologia
Faculdade de Medicina- UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 02 de setembro de 2014, o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação longitudinal clínica e imunológica de pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa da região metropolitana de Belo Horizonte" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.


Prof.ª Dr.ª Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO A – Aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa

CENTRO DE PESQUISAS
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento, avaliação e custo-efetividade da técnica ζ Loop-mediated isothermal amplification ζ para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana.

Pesquisador: Daniel Moreira de Avelar

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 44545315.7.0000.5091

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPqRR/

Patrocinador Principal: Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPqRR/ FIOCRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.229.004

Apresentação do Projeto:

O presente projeto visa comparar a eficácia de 2 técnicas de LAMP "Loop-mediated isothermal amplification" para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar em pacientes com suspeita clínica da doença.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar a técnica de LAMP com três abordagens metodológicas para o gda leishmaniose tegumentar americana.

- 1) LAMP-LT kDNA;
 - 2) LAMP-18S rRNA;
 - 3) PCR (kDNA).
- 0,

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De imediato os pacientes não terão um benefício direto, talvez uma avaliação com técnicas mais sensíveis. Haverá um pequeno desconforto para o paciente na coleta de fragmentos por biópsia sob anestesia local.

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715

Bairro: Barro Preto

CEP: 30.190-002

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3349-7825

Fax: (31)3349-7825

E-mail: cepsh-cpqr@cpqrr.fiocruz.br

**CENTRO DE PESQUISAS
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/**



Continuação do Parecer: 1.229.004

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É um estudo bem elaborado com delineamento experimental adequado e fundamentação científica apropriada. Os resultados obtidos poderão ter aplicabilidade em Saúde Humana

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os questionamentos da relatoria foram respondidos no TCLE.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Após submissão e análise criteriosa do protocolo em questão, constatamos que o estudo atende aos aspectos fundamentais da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Diante do exposto, o Comitê de Ética do CPqRR/FIOCRUZ Minas, de acordo com as atribuições à ele concedidas pela Legislação vigente, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto. Firma-se diante deste documento a necessidade de serem apresentados os relatórios anuais e final, bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Folha de Rosto	Folha de Rosto para Pesquisa.pdf	30/04/2015 10:04:14		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_507238.pdf	30/04/2015 10:14:48		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_projeto_LAMP_LT (1).docx	03/07/2015 10:27:03		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_507238.pdf	03/07/2015 10:28:16		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_LAMP_LT_completo.pdf	10/07/2015 12:07:21		Aceito
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_507238.pdf	10/07/2015		Aceito

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715

Bairro: Barro Preto

CEP: 30.190-002

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3349-7825

Fax: (31)3349-7825

E-mail: cepsh-cprr@cprr.fiocruz.br

CENTRO DE PESQUISAS
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/



Continuação do Parecer: 1.229.004

Básicas do Projeto	ETO_507238.pdf	12:08:43		Aceito
--------------------	----------------	----------	--	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 15 de Setembro de 2015

Assinado por:
Naftale Katz
(Coordenador)