

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE SUBGÊNERO,
COMPLEXO E ESPÉCIES DE *Leishmania***

**Beatriz Batista Trigo
Bióloga**

**ARAÇATUBA – SP
2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE SUBGÊNERO,
COMPLEXO E ESPÉCIES DE *Leishmania***

Beatriz Batista Trigo
Orientadora: Profa. Adjunto Cáris Maroni Nunes
Co-orientadora: Dra. Silvana de Cássia Paulan

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

**ARAÇATUBA-SP
2018**

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Trigo, Beatriz Batista

T828d

Diferenciação molecular de subgênero, complexo e espécies de
Leishmania / Beatriz Batista Trigo.

Araçatuba: [s.n], 2018.

56 f. il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, 2018

Orientador: Prof. Adjunto Cárís Maroni Nunes

Co-orientadora: Dra. Silvana de Cássia Paulan

1. Leishmaniose. 2. Diagnóstico diferencial. 3. Reação em
cadeia da polimerase em tempo real.. I. T.

CDD 616.9364



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA


Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE SUBGÊNERO, COMPLEXO E ESPÉCIES DE
Leishmania

AUTORA: BEATRIZ BATISTA TRIGO
ORIENTADORA: CÁRIS MARONI NUNES
COORIENTADORA: SILVANA DE CÁSSIA PAULAN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. CÁRIS MARONI NUNES
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. VALÉRIA MARÇAL FELIX DE LIMA
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Dr. ADAM TAITI HARTH UTSUNOMIYA
Doutor em Genética pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal/Unesp

Araçatuba, 01 de agosto de 2018.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BEATRIZ BATISTA TRIGO – nascida na cidade de Araçatuba – SP em 10 de julho de 1993. Graduada em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium (UniSALESIANO), campus de Araçatuba, em janeiro de 2015, com o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Prevalência da Doença de Alzheimer na cidade de Araçatuba-SP” sob orientação da Professora Rossana Abud Cabrera Rosa. Foi bolsista de Iniciação Científica na área de Ciência Animal no Laboratório de Endocrinologia Animal na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) - UNESP de 2012 a 2014 com os seguintes projetos: “Produção e caracterização de anticorpos policlonais para pesquisa de enrofloxacin em produtos de origem animal” e “Padronização da quantificação do fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-I) bovino pela técnica de radioimunoensaio” sob orientação do Professor Adjunto Guilherme de Paula Nogueira. Ingressou no programa de pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) – UNESP em 2016 como aluna regular de mestrado. Em 15 de março de 2018 foi aprovada no Exame Geral de Qualificação com o trabalho intitulado “Selection and validation of species-specific *Leishmania* DNA sequences”.

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.”

Abraham Lincoln

À Deus por todas as bênçãos e aos meus pais Nilton e Isabel por todo o apoio, carinho, paciência, amor e por sempre acreditarem em minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba; ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e à CAPES pela bolsa de Mestrado.

À Professora Adjunto Cárís Maroni Nunes pela oportunidade, orientando sempre com muita competência, carinho e paciência e sendo sempre, além de tudo, uma amiga.

À Dra. Silvana de Cássia Paulan por aceitar ser minha co-orientadora, por me ajudar sempre que precisei, sendo sempre atenciosa, companheira, competente e amiga.

À Fernanda Muller de Oliveira-Rovai pela oportunidade de continuar um trabalho tão bonito, interessante e de extrema importância, e aos colaboradores Pier Kenji Rauschkolb Katsuda Ito, Marco Milanesi e Yuri Tani Utsunomiya por todas as ideias e suporte para que esse trabalho fosse desenvolvido.

À Dra. Sarita Priscila Gobbo Ferrari por todo o apoio, carinho e oportunidades, sendo uma grande amiga e mentora.

Aos colegas que ainda estão ou passaram pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular durante esse período: obrigada por todo apoio e convívio.

À Professora Valéria Marçal Felix de Lima, Professora Flávia Lombardi Lopes, e ao Professor Marcelo Vasconcelos Meireles por toda a ajuda prestada, e à equipe de seus laboratórios em especial a técnica Flávia Yamamoto, aos pós-graduandos Larissa Melo, Bruna Nicoleti e ao Dr. Alex Nakamura por todo o auxílio e suporte.

À Professora Vânia da Matta do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, ao Professor José Ângelo Lindoso, à Doutora Kelly Kanunfre e à Mestre Edite Hatsumi Kanashiro do Instituto de Medicina Tropical da USP, e à Professora Valéria Marçal Felix de Lima da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP pelas cepas de *Leishmania* cedidas para a realização desta pesquisa.

Ao Professor Guilherme de Paula Nogueira por me dar a primeira oportunidade de ingressar como IC na FMVA e por todo o aprendizado; à Devani Mariano Pinheiro por todos os ensinamentos e à todos os que fizeram parte da equipe do Lab. de Endocrinologia Animal durante minha passagem por lá.

À bolsista de PIBIC Jr. Dominiki Kanae por toda a ajuda prestada.

Aos meus professores da graduação de Ciências Biológicas do UniSalesiano que foram fundamentais para meu crescimento e formação acadêmica e profissional, e a todos os professores que passaram por minha vida, desde o Fundamental até o Ensino Médio, por todos os ensinamentos fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui.

Às minhas amigas Tamires Goulart, Letícia Tajiri, Natyele Macarini por sempre acreditarem em mim, por todo o apoio e paciência.

Ao meu namorado Demetrius Peres por todo o amor, carinho, paciência, por ser meu ombro-amigo sempre me ouvindo e sendo sensato. Obrigada por acreditar em mim e nos meus sonhos.

À toda a minha família que direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista, em especial ao meu primo Vitor Trigo Assêncio (*in memoriam*) que sempre me deu força para seguir nessa área da pesquisa e que contribuiu para que tudo isso acontecesse.

Aos meus pais Nilton Godoy Trigo e Maria Isabel Marques Batista Trigo que foram fundamentais para que eu chegasse até aqui, que sempre me apoiaram com muito amor, carinho e dedicação, que ouvem minhas angústias e sempre tem palavras de apoio. Esse trabalho é pra vocês em agradecimento por toda dedicação.

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	13
Agente etiológico	16
Vetor	17
Transmissão	18
Reservatórios.....	20
Medidas de prevenção, controle e diagnóstico das leishmanioses	20
Diferenciação molecular das espécies de <i>Leishmania</i>	22
Objetivo geral.....	24
Objetivos específicos.....	24
REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO 2 – Avaliação de oligonucleotídeos específicos para o diagnóstico molecular das leishmanioses*	32
Resumo.....	32
1 Introdução.....	33
2 Material e Métodos	34
2.1 Seleção de <i>primers</i> específicos para <i>Leishmania</i> e avaliação <i>in silico</i>	34
2.2 Avaliação dos <i>primers</i> por PCR em tempo-real (qPCR)	35
3 Resultados e Discussão.....	37
4 Conclusões	43
Referências.....	44
APÊNDICE(S).....	49

DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE SUBGÊNERO, COMPLEXO E ESPÉCIES DE *Leishmania*

RESUMO - As diferentes espécies de *Leishmania* causam amplo espectro de manifestações clínicas sendo genericamente classificadas em leishmaniose cutanêa (LC), mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV), acometendo tanto crianças como adultos, e várias espécies de mamíferos. Para a identificação da espécie faz-se necessário o isolamento do protozoário a partir de amostras biológicas e o diagnóstico em laboratórios de referência. Atualmente, o “padrão ouro” para identificação de cepas de *Leishmania* spp. em estudos epidemiológicos é o *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE), a qual é uma técnica laboriosa e de aplicação restrita à amostras em cultivo. As técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido bastante utilizadas para caracterizar e diferenciar as espécies de *Leishmania*. Tal diferenciação pode ser importante para a determinação do tratamento correto aos pacientes, diminuindo a letalidade, e para estudos epidemiológicos com o mapeamento do padrão de distribuição das leishmanioses, auxiliando assim na priorização das medidas de controle desta zoonose. A presente pesquisa teve como objetivo avaliar *in silico* os oligonucleotídeos iniciadores já utilizados no diagnóstico molecular e validar, por PCR em Tempo Real, sua especificidade em cepas de referência cultivadas *in vitro*.

Palavras-Chave: Diagnóstico diferencial, leishmaniose, Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real

MOLECULAR DIFFERENTIATION OF *Leishmania* SUBGENUS, COMPLEX AND SPECIES

SUMMARY - Different species of *Leishmania* cause a wide spectrum of clinical manifestations which are generically classified as cutaneous leishmaniasis (CL), mucocutaneous (MCL) and visceral leishmaniasis (VL), affecting children and adults, as well as several species of mammals. Species identification requires isolating the protozoan from biological samples and the use of diagnostic techniques done in reference laboratories. Currently, the "gold standard" for identifying strains of *Leishmania* spp. in epidemiological studies is the multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), which is a laborious technique and restricted used in cultured samples. Techniques based on the Polymerase Chain Reaction (PCR) are being more frequently used in order to characterize and differentiate *Leishmania* species. Such differentiation is important to indicate the adequate treatment for the patients minimizing lethality and for epidemiological purposes as mapping its distribution pattern, in order to help prioritizing the control measures for this zoonosis. The present research aimed to evaluate the currently used primers for molecular diagnosis and validate them by Real Time PCR for their specificity in reference strains cultivated *in vitro*.

Keywords: Differential diagnosis, leishmaniasis, Real-time polymerase chain reaction

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) e transmitidas por insetos flebotomíneos, sendo a espécie *Lutzomyia longipalpis* o principal vetor da leishmaniose visceral (LV) no Brasil (BRASIL, 2014). Diversas espécies de mamíferos, incluindo o homem e o cão, são afetadas por esta doença (BRASIL, 2017).

Mais de 98 países e territórios, principalmente nas regiões tropicais, são endêmicos para as leishmanioses devido a fatores ambientais que favorecem a presença dos vetores, sendo que mais de 90% dos novos casos registrados em 2014 ocorreram em seis países: Etiópia, Índia, Somália, Sudão, Sudão do Sul e Brasil (WHO, 2016; 2018) (Figura 1).

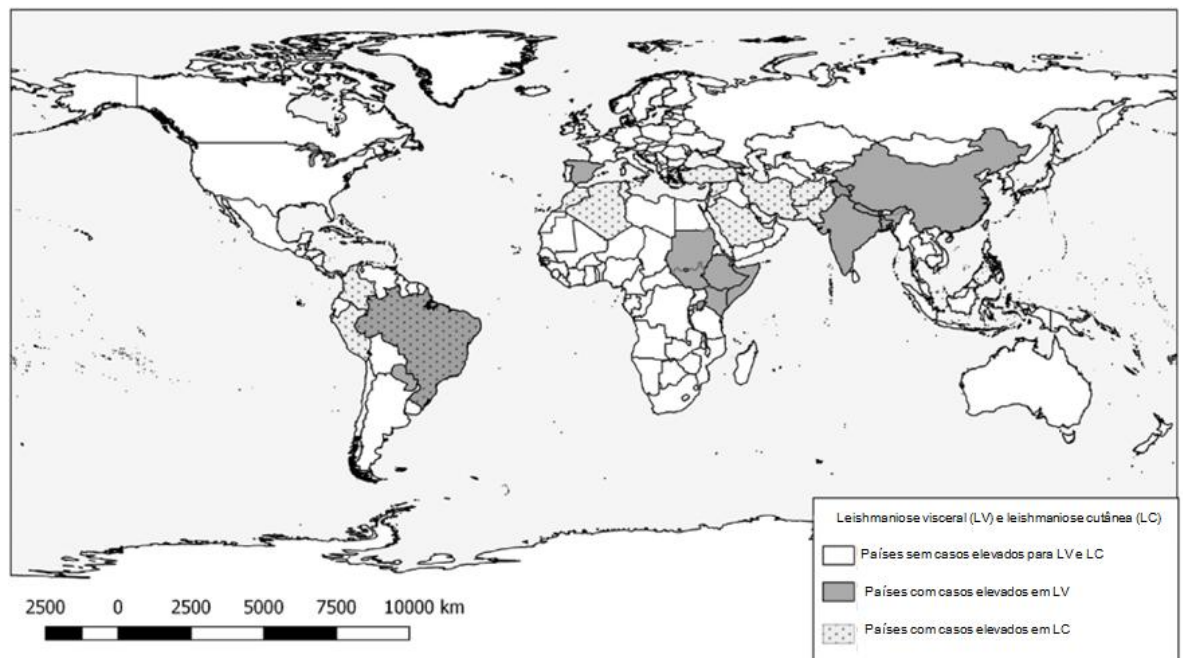


FIGURA 1 – Distribuição mundial das leishmanioses visceral e cutânea. Fonte: Adaptado de WHO (2016).

Populações carentes em condição de desnutrição, com sistema imunológico enfraquecido, com restrição de recursos e habitação precária são as que apresentam maior risco de contraírem a doença e, como consequência, a cada ano aproximadamente 1,3 milhões de casos em humanos são registrados no mundo, resultando entre 20 e 30 mil mortes por ano (WHO, 2018).

Existem mais de 20 espécies de *Leishmania* que são conhecidas por causar um amplo espectro de manifestações clínicas as quais são classificadas em: Leishmaniose Cutânea (LC), caracterizada pelo aparecimento de lesões nas partes mais expostas do corpo como a face, braços e pernas; Leishmaniose Mucocutânea (LMC), caracterizada por lesões que levam à destruição total ou parcial das membranas mucosas do nariz, boca e cavidade da garganta; Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como kalazar, potencialmente fatal e caracterizada pela perda de peso, febre irregular, aumento do baço e do fígado, anemia; e a Leishmaniose dermal Post-Kalazar”, caracterizada como uma complicação da LV onde há espectro clínico variável, mas que se difere das LC por não apresentarem as lesões em forma “vulcânica” e nem sempre apresentam distribuição peri-oral (WHO, 2018).

No Brasil estão presentes três formas clínicas (LC, LMC e LV) da doença, (BRASIL, 2018; WHO, 2018) e, considerando-se o continente americano, 96% dos casos de LV estão concentrados no Brasil, com ampla distribuição geográfica, destacando-se as regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (OPAS/OMS, 2018) (Figura 2).

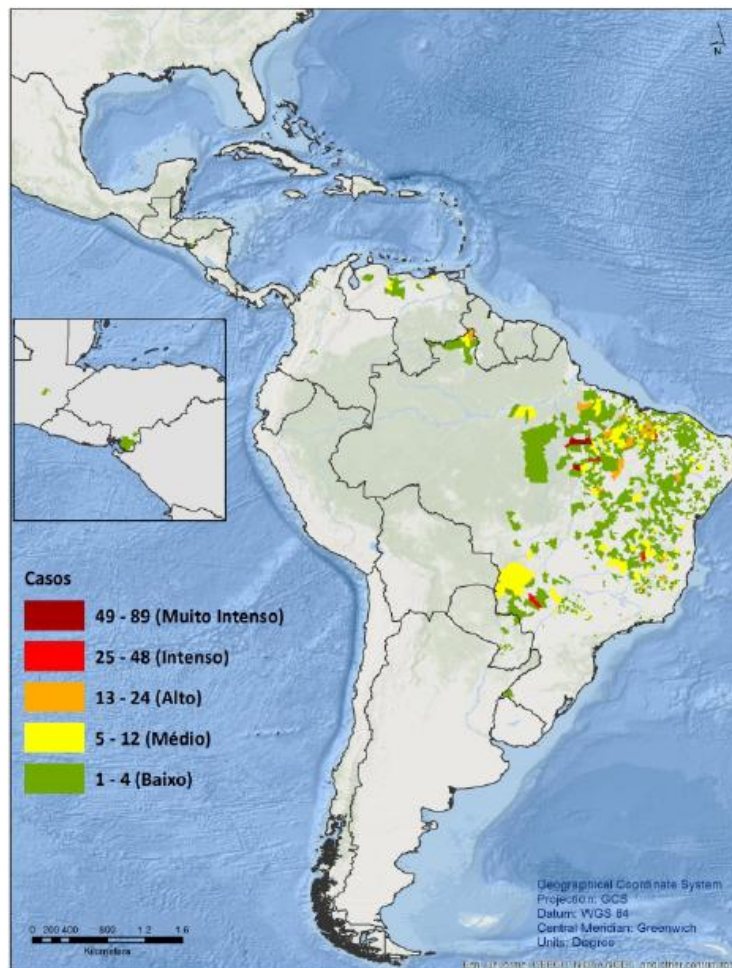


FIGURA 2 – Distribuição da leishmaniose visceral nas Américas. Fonte: OPAS/OMS (2018).

Inicialmente, a LV apresentava caráter eminentemente rural, expandindo-se para as áreas urbanas a partir da década de 80 devido a alterações ambientais, aumento da interação entre animais silvestres e domésticos decorrente dos desmatamentos, adaptação do vetor ao meio urbano e ao êxodo rural, tornando-se um grave problema de saúde pública no Brasil (ALVAR et al., 2004; BARÇANTE, 2015; SOLANO-GALEGO et al., 2009).

O estado de São Paulo teve uma rápida disseminação de casos da LV humana e canina nas últimas duas décadas, e passou a se distribuir nos centros urbanos, se estendendo do noroeste para o sudeste, em direção à

região de Bauru, acompanhando o avanço da rodovia Marechal Rondon e o gasoduto Bolívia-Brasil (CARDIM et al., 2013; SEVÁ et al., 2017).

Agente etiológico

As leishmânias são protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, sendo dividida em 3 subgêneros: *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania* (REAL et al., 2013; TSOKANA et al., 2014) (Figura 3).

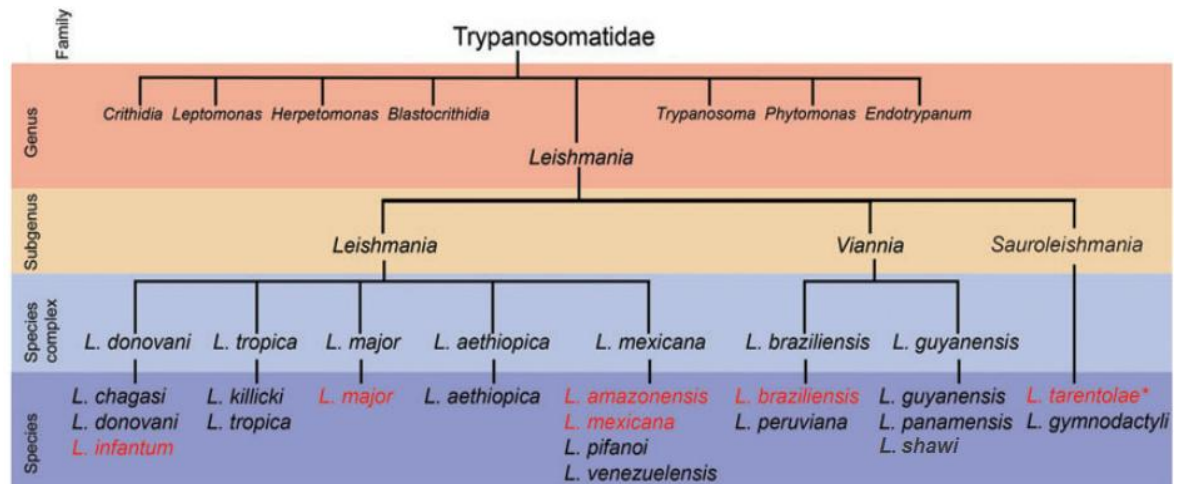


FIGURA 3 – Classificação em família, gênero, subgênero, complexos e espécies da *Leishmania*. Fonte: Adaptado de REAL et al. (2013).

O subgênero *Leishmania* tem espécies presentes no Velho e no Novo Mundo, tendo como principais espécies a *L. major* causando a LC e a *L. donovani* causando LV, no Velho Mundo, a *L. amazonensis* causando LC e a *L. infantum* causando LV no Novo Mundo. Já o subgênero *Viannia* está distribuído exclusivamente na região tropical das Américas, causando infecções cutâneas e mucocutâneas, tendo como principal espécie a *L. braziliensis* (BATES, 2007; BRASIL, 2017). O subgênero *Sauroleishmania* compreende as espécies não patogênicas para os humanos sendo encontradas principalmente em répteis (RAYMOND et al., 2012).

O comportamento das formas promastigotas no tubo digestório do vetor têm sido usado como parâmetro de classificação taxonômica do gênero *Leishmania*, sendo classificadas em *Viannia* as que apresentam desenvolvimento na região do piloro e seção peripilária e *Leishmania* para as espécies que se desenvolvem na região suprapilária do vetor (LAISON; SHAW, 1987).

Tal classificação tem sido confirmada por meio de análises filogenéticas baseadas em diferentes métodos moleculares, entre eles a técnica de Eletroforese de enzima multiloco (*Multilocus Enzyme Electrophoresis* – MLEE) (TSOKANA et al., 2014).

Vetor

Os protozoários causadores das leishmanioses têm um ciclo de vida digenético complexo, exigindo um hospedeiro vertebrado suscetível e um inseto vetor (SAVOIA, 2015). Os vetores transmissores pertencem à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (AKHOUNDI et al., 2016) sendo divididos em gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e em *Lutzomyia* no Novo Mundo (PACE, 2014).

Os flebotomíneos necessitam de suprimentos de carboidratos os quais serão adquiridos principalmente da seiva das plantas (ALEXANDER; USMAS, 1994). Exclusivamente as fêmeas se alimentam de sangue de vertebrados para a maturação dos ovos (DIAS; LOROSA; REBÊLO, 2003),

No continente Americano, a transmissão das leishmanioses ocorre por espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. No Brasil, a transmissão das leishmanioses tegumentares ocorre pelas espécies *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. intermedia*, *Lu. whitmani*, *Lu. wellcomei*, entre outras. Para a LV, a transmissão ocorre principalmente pela espécie *Lu. longipalpis* (Figura 4), sendo a mais importante para transmissão da LV no Brasil principalmente se for considerada a sua capacidade de adaptação em diversos habitats (BRASIL,

2014; WHO, 2018). Em áreas onde a presença de *Lu. longipalpis* não são registradas, outros vetores foram reportados, como é o caso do *Lu. cruzi* (SANTOS et al., 1998) no Mato Grosso do Sul.



FIGURA 4 – Foto ampliada de fêmea de flebotomíneo adulto. Fonte: BRASIL (2014).

Os *L. longipalpis* medem de 1 a 3 mm de comprimento, possuem o corpo revestido por pelos de coloração clara e são facilmente reconhecíveis por apresentarem voos em pequenos saltos e pousares com as asas entreabertas. Na fase adulta, estes insetos se adaptam facilmente em diversos ambientes porém, na fase larvária, necessitam de ambientes terrestres úmidos, ricos em matéria orgânica e de baixa incidência de luz (BRASIL, 2014). Estes flebotomíneos possuem atividade crepuscular e noturna e são facilmente encontrados próximos a uma fonte de alimento (BRASIL, 2014), tendo como preferência alimentar os pássaros, cães, humanos, cavalos, felinos, roedores entre outros (AFONSO et al., 2012).

Transmissão

A transmissão do protozoário ocorre quando fêmeas de flebotomíneo infectadas inoculam, durante o repasto sanguíneo, as formas promastigotas dos protozoários na pele do hospedeiro. As formas promastigotas são então fagocitadas por macrófagos, dentro dos quais, se diferenciam na forma amastigota e se reproduzem, resultando na ruptura da célula, e infecção de novos macrófagos. O ciclo biológico do protozoário continua quando o hospedeiro infectado é picado pelo flebotomíneo, que ingere as formas amastigotas. No trato digestório do vetor, os protozoários passam por um complexo processo, que dura de 3 a 5 dias, até se transformarem em promastigotas metacíclicas, forma infectante para mamíferos (HANDMAN; BULLEN, 2002; KATO et al., 2010; KILLICK-KENDRICK, 1990) (Figura 5).

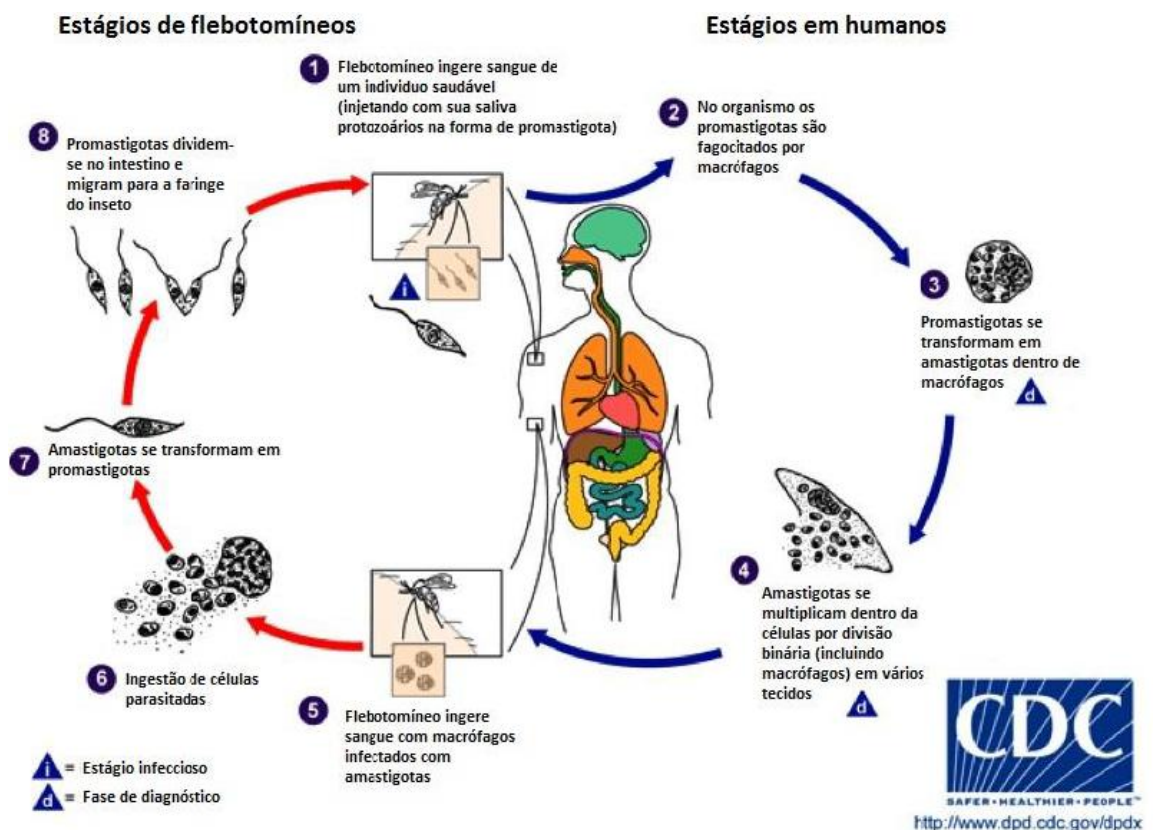


FIGURA 5 – Ciclo de transmissão da *Leishmania* spp. Fonte: Adaptado de “Center for Disease Control”, EUA. (Disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/>).

Esta transmissão é classificada em zoonótica, quando os animais são os reservatórios principais e, antroponótica, quando o humano assume esse papel (DESJEUX, 2004).

Reservatórios

Os reservatórios são capazes de manter a transmissão e permitir a persistência da doença (FUKAMI; NISHIURA, 2015). Várias espécies têm potencial a serem reservatórios de *Leishmania* spp., sendo tanto animais silvestres, como domésticos. Roedores, primatas, lobos, morcegos, cães e gatos são exemplos de potenciais reservatórios (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017; ROQUE; JANSEN, 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

Os cães domésticos são considerados os principais reservatórios para a LV no perímetro urbano, tendo importante papel epidemiológico na manutenção do ciclo do parasita no ambiente urbano (ALVAR et al., 2012).

Apesar de serem necessários mais estudos para a compreensão de seu papel no ciclo da LTA, os principais reservatórios são os ratos e os cães (BRITO et al., 2012; KENT et al., 2013)

Medidas de prevenção, controle e diagnóstico das leishmanioses

O Ministério da Saúde do Brasil elaborou o Manual de Vigilância, Prevenção e Controle de Zoonoses que compreende estratégias de vigilância de zoonoses, dentre elas as LV e LC (BRASIL, 2016).

As medidas de prevenção da LV estão divididas em três grandes tópicos: 1) medidas dirigidas à população humana que preconizam a proteção individual como o uso de repelentes, mosquiteiro e telagem de portas e janelas; 2) medidas dirigidas ao vetor como o manejo e saneamento ambiental através da limpeza urbana e eliminação e destinação adequadas de resíduos orgânicos, visando reduzir o número de ambientes propícios ao vetor; 3)

medidas dirigidas aos cães como o uso de telas em canis e de coleiras impregnadas com inseticidas, como medida de prevenção individual. Além disso, a educação em saúde, e a capacitação das equipes de profissionais de áreas afins para diagnóstico precoce e tratamento adequado são primordiais para o controle desta zoonose (BRASIL, 2016).

As medidas de controle da LV também podem ser divididas em tópicos: as dirigidas ao controle do vetor, com o uso de inseticidas que devem ser aplicados dependendo das características epidemiológicas e entomológicas de cada localidade; as dirigidas ao controle do reservatório canino que compreendem a identificação e eutanásia dos cães com sorologia ou exame parasitológico positivos e as dirigidas ao paciente humano que compreendem o diagnóstico e tratamento precoces (BRASIL, 2016).

Para a LC, também chamada de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), as medidas de prevenção são as mesmas preconizadas para a LV. Já as medidas de controle compreendem a vigilância e a pesquisa entomológica nos focos, a vigilância dos reservatórios silvestres e dos animais domésticos, além do diagnóstico e tratamento dos pacientes humanos (BRASIL, 2016).

De maneira geral, o diagnóstico das leishmanioses é feito por meio da observação das manifestações clínicas e por meio de testes parasitológicos (WHO, 2018).

Para a LV os testes imunológicos são feitos por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), por testes imunocromatográficos ou por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os testes parasitológicos são confirmatórios, com a observação de formas amastigotas do parasito em amostras biológicas dos pacientes (BRASIL, 2017).

A identificação do reservatório canino da LV é atualmente realizada por duas técnicas: o teste imunocromatográfico rápido “dual path platform” (TR-DPP) para a triagem, e o teste ELISA, para confirmação dos cães positivos (BRASIL, 2016; BRASIL, 2017).

Para a LTA, o diagnóstico laboratorial é constituído pelos exames parasitológico (esfregaço da lesão ou *imprint* de fragmentos de tecido do

paciente), imunológico (sorologia por imunofluorescência indireta, ou intradermorreação de Montenegro, ou ensaio imunoenzimático-ELISA), e molecular, geralmente por meio da reação em cadeia pela polimerase (BRASIL, 2017).

Nos casos dos animais domésticos diagnosticados com a LTA em áreas de ocorrência concomitante com LV, é necessária a identificação da espécie do parasito. Apesar de o tratamento não ser uma medida aceita para o controle da LTA, não é recomendada a eutanásia dos animais como forma de controle, a menos que os animais evoluam para lesões que causem sofrimento (BRASIL, 2017).

Diferenciação molecular das espécies de *Leishmania*

Uma das limitações dos testes sorológicos e parasitológicos é que não permitem a diferenciação das espécies de *Leishmania* envolvidas nas infecções. Em áreas que apresentam diferentes formas clínicas da doença, como ocorre no Brasil, é interessante a possibilidade de se realizar a diferenciação das espécies envolvidas, não só do ponto de vista epidemiológico, como para a determinação do prognóstico da doença e para indicação terapêutica, uma vez que os medicamentos utilizados apresentam certo grau de toxicidade, e a dose e o tempo de tratamento dependem da forma clínica da doença (AKHOUNDI et al., 2016; MEDLEY et al., 2015; PELISSARI et al., 2011; SCHRIEFER; WILSON; CARVALHO, 2008).

Atualmente, o “padrão ouro” para identificação de cepas de *Leishmania* spp. em estudos epidemiológicos é a Eletroforese de Enzima *Multilocus* (MLEE), baseado na motilidade de isoenzimas (DE MORAIS et al., 2016; DE SANTIS et al., 2011; SCHÖNIAN; KUHLS; MAURICIO, 2011). Contudo, este método se baseia em enzimas altamente conservadas e dependentes de um padrão de mobilidade eletroforético e, alterações na composição dos aminoácidos, podem causar uma interpretação equivocada dos resultados.

Além disso, a MLEE é uma técnica laboriosa e demorada, economicamente pouco viável em larga escala e de aplicação restrita à amostras de culturas por necessitar de um número abundante de parasitas (DE MORAIS et al., 2016; KUHLS et al., 2007; OCHSENREITHER et al., 2006).

O uso de técnicas moleculares cresce relevantemente por conta da alta sensibilidade, especificidade e a possibilidade de aplicação em várias amostras clínicas (GALLUZZI et al., 2018).

As técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vêm sendo descritas para caracterizar e diferenciar as espécies de *Leishmania*, entre elas a PCR seguida de sequenciamento (SCHULZ et al., 2003), a PCR acoplada ao Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP) (AKHOUNDI et al., 2013; DE ANDRADE et al., 2006; VOLPINI et al., 2004) e a Multiplex PCR (JORQUERA et al., 2005), sendo, contudo, técnicas bastante laboriosas.

A PCR em tempo real (qPCR) vem se tornando cada vez mais popular por ser uma técnica mais rápida e por não necessitar de análises posteriores, apresentando menor risco de contaminação cruzada (GALLUZZI et al., 2018).

Paralelamente aos avanços das técnicas moleculares, tecnologias de sequenciamento em larga escala foram sendo desenvolvidas e aprimoradas em conjunto com ferramentas de bioinformática, possibilitando o estudo de genomas completos de diversos organismos, dentre os quais os de *Leishmania* spp. (CANTACESSI et al., 2015; IVENS et al., 2005).

O primeiro genoma de *Leishmania* a ser publicado foi o da *L. major* (IVENS et al., 2005), seguido dos genomas de *L. infantum* e *L. braziliensis*, feitos concomitantemente (PEACOCK et al., 2007). Posteriormente Downing et al. (2011) e Rogers et al. (2011) publicaram os genomas de *L. donovani* e *L. mexicana*, respectivamente. O primeiro genoma de uma espécie não patogênica, *L. tarentolae*, foi publicado por Raymond et al. (2012), seguido do genoma da *L. amazonensis*, o primeiro genoma montado no Brasil (REAL et al., 2013). Estes genomas estão em constante atualização (ALONSO et al., 2016; GONZÁLEZ-DE LA FUENTE et al., 2017; ROGERS et al., 2011) e, os

dados de sequenciamento, montagem e anotação destes genomas e de outras espécies (*L. aethiopica*, *L. arabica*, *L. enrietti*, *L. gerbilli*, *L. panamensis*, *L. tropica* e *L. turanica*) estão disponibilizados em bancos de dados públicos, compondo importante fonte de recursos para diversos estudos.

Objetivo geral

Avaliar os oligonucleotídeos iniciadores disponíveis na literatura para diferenciação das espécies de *Leishmania* com o intuito de futuramente desenvolver uma plataforma de diagnóstico espécie-específico das leishmânias.

Objetivos específicos

- Avaliar, por PCR eletrônico, os oligonucleotídeos iniciadores disponíveis na literatura utilizando-se os dados genômicos de bancos públicos;
- Avaliar, por PCR em tempo-real, os oligonucleotídeos iniciadores disponíveis na literatura utilizando-se cepas de referência cultivadas *in vitro*.

REFERÊNCIAS

AFONSO, M.M.S.; DUARTE, R.; MIRANDA, J.C. et al. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. **Journal of Tropical Medicina**, v. 2012, 2012. doi: 10.1155/2012/858657.

AKHOUNDI, M.; DOWNING, T.; VOTÝPKA, J. et al. *Leishmania* infections: molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v.57, p 1-29, 2017.

AKHOUNDI, M.; HAJJARAN, H.; BAGHAEI, A. et al. Geographical distribution of leishmania species of human cutaneous leishmaniasis in Fars Province, Southern Iran. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 8, n. 1, p. 85–91, 2013.

AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A. et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1-40, 2016.

ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A review on parasite, vector and reservoir host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, p. 519, 2017.

ALEXANDER, B.; USMAS, M.C. Potential source of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 88, p. 543-549, 1994.

ALONSO, G.; RASTROJO, A.; LÓPEZ-PÉREZ, S. et al. Resequencing and assembly of seven complex loci to improve the *Leishmania major* (Friedlin strain) reference genome. **Parasites & Vectors**, v. 9, 2016. doi: 10.1186/s13071-016-1329-4

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R. et al. Canine leishmaniasis. **Advances in parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C. et al. Leishmaniasis worldwide and globalestimates of its incidence, **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-12, 2012.

BARÇANTE; J.M.P. Urbanização e Leishmaniose. **Revista Pré-Univesp**, n 52, 2015. Disponível em: <<http://pre.univesp.br/urbanizacao-e-leishmaniose#.WygusVVKjIU>>. Acesso em: 14 Jun. 2018.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses: normas técnicas e operacionais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde: Volume único**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL; Ministério da Saúde. **Leishmaniose Visceral (LV)**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-visceral-lv>>. Acesso em: 16 jul. 2018.

BRITO, M.E.F.; ANDRADE, M.S.; DANTAS-TORRES, F. et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in state of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 425-429, 2012.

CANTACESSI, C.; DANTAS-TORRES, F.; NOLAN, M.J. et al. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 3, p. 100–108, 2015.

CARDIM, M.F.M.; RODAS, L.A.C.; DIBO, M.R. et al. Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil, 1999-2011. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, p. 691-700, 2013.

DE ANDRADE, H.M.; REIS, A.B.; DOS SANTOS, S.L. et al. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 3–4, p. 231–238, 2006.

DE MORAIS, R.C.S.; DA COSTA OLIVEIRA, C.N.; DE ALBUQUERQUE, S.C. et al. Real-time PCR for *Leishmania* species identification: Evaluation and comparison with classical techniques. **Experimental Parasitology**, v. 165, p. 43-50, 2016.

DE SANTIS, B.; SANTOS, E.G.O.B.; CUPOLILLO, E. et al. Characterization of *Leishmania infantum* species in dogs from the urban area of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6, p. 771–773, 2011.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DIAS, F.O.P.; LOROSA, E.S.; REBÊLO, J.M.M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 5, p. 1373-80, 2003.

DOWNING, T.; IMAMURA, H.; DECUYPERE, S. et al. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. **Genome Research**, v.21, p.2143-2156, 2011.

FUKAMI, R.; NISHIURA, H. Examining the reservoir potential of animal species for *Leishmania infantum* infection. **Japan Journal of Industrial and Applied Mathematics**, v. 32, p. 661-73, 2015.

GALLUZZI, L.; CECCARELLI, M.; DIOTALLEVI, A. et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 273-86, 2018.

GONZÁLEZ-DE LA FUENTE, S.; PEIRÓ-PASTOR, R.; RASTROJO, A. et al. Resequencing of the *Leishmania infantum* (strain JPCM5) genome and *de novo* assembly into 36 contigs. **Scientific Reports**, v. 7, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-18374-y

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332–334, 2002.

IVENS, A.C.; PEACOCK, C.S.; WORTHEY, E.A. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005.

JORQUERA, A.; GONZÁLEZ, R.; MARCHÁN-MARCANO, E. et al. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 45–48, 2005.

KATO, H.; GOMEZ, E.A.; CÁCERES, A.G. et al. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 3, p. 814-826, 2010.

KENT, A.; RAMKALUP, P.; MANS, D. et al. Is the dog a possible reservoir for cutaneous leishmaniasis in Suriname? **Journal of Tropical Medicine**, v. 2013, p 324140, 2013.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de parasitologie humaine et comparee**, v. 65, Suppl 1, p. 37–42, 1990.

KUHLS, K.; KEILONAT, L.; OCHSENREITHER, S. et al. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 3, p. 334–343, 2007.

LAISON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-DENDRICK, R. (Ed.) **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1987, p. 1-20.

MEDLEY, G.F.; HOLLINGSWORTH, T.D; OLLIARO, P.L. et al. Health-seeking behaviour, diagnostics and transmission dynamics in the control of visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **Nature**, v. 528, n. 7580, p. S102–S108, 2015.

OCHSENREITHER, S.; KUHLS, K.; SCHAAR, M. et al. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 495–503, 2006.

OLIVEIRA, F.M.; COSTA, L.H.C.; BARROS, T.L. First detection of *Leishmania* spp. DNA in brazilian bats captured strictly in urban areas. **Acta Tropica**, v. 150, p. 176-181, 2015.

OPAS/OMS - Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas. **Informe de Leishmanioses**, n. 6, 2018. Disponível em: <www.paho.org/leishmaniasis>. Acesso em: 02 Jul. 2018.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v 69, p. S10-S18, 2014.

PEACOCK, C. S.; SEEGER, K.; HARRIS, D. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature genetics**, v. 39, n. 7, p. 839–847, 2007.

PELISSARI, D. M.; CECHINE, M. P.; SOUSA-GOMES, M. L. et al. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil.

Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 20, doi: 10.5123/S1679-49742011000100012, 2011.

RAYMOND, F.; BOISVERT, S.; ROY, G. et al. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**, v.40, p.1131-1147, 2012.

REAL, F.; VIDAL, R.O.; CARAZZOLLE, M.F. et al. The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. **DNA Research**, v.20, p.567-581, 2013.

ROGERS, M.B.; HILLEY, J.D.; DICKENS, N.J. et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Research**, v.21, p. 2129-2142, 2011.

ROQUE, A.L.R.; JANSEN, A.M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, p. 251-262, 2014.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.R.; HOGGMANN, A.A. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 6, p. 588-596, 2015.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 6, p. 588-596, 2015.

SCHÖNIAN, G.; KUHLS, K.; MAURICIO, I. L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. **Parasitology**, v. 138, n. 4, p. 405–425, 2011.

SCHRIEFER, A.; WILSON, M. E.; CARVALHO, E. M. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to

human leishmaniasis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 21, n. 5, p. 483–488, 2008.

SCHULZ, A.; MELLENTHIN, K.; SCHONIAN, G. et al. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1529–1535, 2003.

SEVÁ, A.P.; MAO, L.; GALVIS-OVALLOS, F. et al. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersión in São Paulo State, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 11, n. 2, e0005353, 2017.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1–2, p. 1–18, 2009.

TSOKANA, C.N.; ATHANASIOU, L.V.; VALIAKOS, G. et al. Molecular diagnosis of leishmaniasis, species identification and phylogenetic analysis. In: CLABORN, D. **Leishmaniasis: Trends in epidemiology, diagnosis and treatment**. IntechOpen, 2014, DOI: 10.5772/57448.

VOLPINI, Â.C.; PASSOS, V.M.; OLIVEIRA, G.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. 31–37, 2004.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological record**. n. 22, p. 285-296, Geneva: World health organization, 2016.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 07 jul. 2018.

CAPÍTULO 2 – Avaliação de oligonucleotídeos específicos para o diagnóstico molecular das leishmanioses*

RESUMO

As leishmanioses são zoonoses causadas por mais de 20 espécies de *Leishmania* e se apresentam sob diferentes formas clínicas. A detecção e identificação das espécies é importante do ponto de vista epidemiológico e terapêutico, porém, a técnica “padrão ouro” para realizar essa diferenciação, a Eletroforese de Enzimas *Multilocus* (MLEE), é laboriosa e economicamente pouco viável, motivos pelos quais vem sendo substituída por técnicas moleculares. Objetivou-se avaliar *in silico*, por meio de técnicas de bioinformática e *in vitro*, por meio de técnica molecular (qPCR), oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) *Leishmania* espécie-específicos já descritos na literatura. Após análise por PCR eletrônica (e-PCR) e filtragem, dos 116 pares de *primers* selecionados, nove (09) se mostraram condizentes com o descrito na literatura. A avaliação *in vitro* por qPCR resultou em cinco (05) pares específicos seja a nível da espécie, complexo ou subgênero de *Leishmania*. A abordagem utilizada propicia rapidez e economia de recursos para validação de diagnóstico molecular específico para *Leishmania*.

Palavras-Chave

Leishmania; Diagnóstico diferencial; Diferenciação molecular; e-PCR; qPCR

*Segundo normas da Revista Acta Tropica

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) que acometem diversas espécies de mamíferos, incluindo o homem e o cão, representando um importante problema de saúde global (Akhoundi et al., 2017; Galluzzi et al., 2018).

Mais de 20 espécies são conhecidas por causarem um amplo espectro de manifestações clínicas, sendo que diversas regiões apresentam a ocorrência de duas ou mais formas clínicas da doença (WHO, 2018).

A detecção e a identificação das espécies de *Leishmania* possibilitam a determinação do prognóstico, de soluções terapêuticas e da epidemiologia das leishmanioses (Schriefer et al., 2008; Medley et al., 2015), sendo a técnica de Eletroforese de Enzima *Multilocus* (MLEE) o “padrão-ouro” (Schönian et al., 2011). Entretanto, este método é laborioso e de aplicação restrita à amostras de cultivo, além de poder haver interpretação errônea dos resultados em casos de alterações na composição dos aminoácidos alvos (Ochsenreither et al., 2006; Kuhls et al., 2007; De Moraes et al., 2016).

Em contrapartida, técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) têm possibilitado seu uso em diferentes amostras biológicas, resultando em sensibilidade e especificidade elevadas, além de rapidez de execução (Galluzzi et al., 2018).

Diversos autores já utilizaram a técnica de qPCR, associadas ou não à outras análises moleculares para diferenciar espécies de *Leishmania*, como a

PCR seguida de sequenciamento, PCR acoplada ao Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP) e a PCR Multiplex (Schulz et al., 2003; Akhoundi et al., 2013; Conter et al., 2018). O sucesso e especificidade desta técnica dependem do conhecimento prévio das sequências alvo (Tsokana et al., 2014), conseqüentemente, da disponibilidade de informações genômicas e de ferramentas de bioinformática que permitam a análise destes dados (Ivens et al., 2005; Cantacessi et al., 2015). Em adição, a análise *in silico*, previamente às técnicas moleculares, propicia economia de tempo para a geração de resultados, sem custo adicional (Schuler, 1997).

O objetivo desse trabalho foi aliar, por meio de técnicas de bioinformática, as informações genômicas disponíveis em bancos de dados públicos com técnicas moleculares para avaliar a especificidade de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) já descritos na literatura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção de *primers* específicos para *Leishmania* e avaliação *in silico*

Utilizando-se as informações de artigos científicos já publicados foram selecionados *primers* subgênero-específicos, complexo-específicos e espécie-específicos (Tabela Suplementar 1).

A avaliação *in silico* dos *primers* foi realizada por meio da PCR eletrônica (Electronic PCR - e-PCR) (Schuler, 1997) permitindo-se o alinhamento destes com a sequência alvo. Para esta análise foram utilizadas todas as sequências

genômicas de *Leishmania* spp., disponíveis no banco de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI), do TriTrypDB, e de *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L. mexicana* (MHOM/BZ/1982/BEL21), *L. guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) e *L. shawi* (MHOM/BR/1984/M8408), as quais pertencem a um banco de dados do LBBMA, FMVA-UNESP que poderá ser disponibilizado mediante solicitação.

Após a e-PCR, a filtragem dos *primers* resultantes foi realizada utilizando-se o programa estatístico R (R Core Team, 2013), considerando-se os parâmetros: i) alinhamento condizente com a especificidade relatada na literatura; ii) tamanho do fragmento de DNA amplificado entre 80 e 250 pares de bases (pb); iii) ausência de *gaps* ou *mismatches* em alinhamento contra a espécie ao qual é referente; iv) mais de 5 *gaps* e *mismatches* em alinhamento contra demais espécies.

2.2 Avaliação dos *primers* por PCR em tempo-real (qPCR)

O conjunto de pares de *primers* filtrados foi submetido à avaliação por qPCR, utilizando-se nove (09) cepas de *Leishmania*: *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/1972/LD46), *L. guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. major* (LV 39 MRHO/Sv/59/P), *L. mexicana* (MHOM/BZ/1982/BEL21), *L. shawi* (MHOM/BR/1984/M8408), *L. panamensis* (C18-176) e *L. chagasi* (cepa isolada no município de Araçatuba-SP e mantida no Laboratório de Imunologia da FMVA/UNESP).

A extração de DNA das cepas foi realizada com o kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen®), seguindo-se as instruções do fabricante obtendo um volume final de 50µl. As reações da qPCR foram realizadas em triplicata, em termociclador *Real Time IQ™5* (Bio-Rad®), em volume final de 20µL contendo entre 30-50ng de DNA total (avaliados por Nanodrop® - ND-1000 Spectrophotometer), 10µM de cada *primer* e 10 µL de *Power SYBR™ Green PCR Master Mix* (Applied BioSystems®). Após a etapa de ativação da enzima *AmpliTaq Gold®* (95°C por 10 minutos), a amplificação ocorreu em um total de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos para a etapa de denaturação da dupla fita de DNA e a 60°C por 60 segundos para o anelamento dos *primers* e extensão do fragmento alvo.

A análise de curva de dissociação foi realizada submetendo-se as amostras à temperaturas de 55 a 95°C, com um aumento gradual de 0,5°C/s. Como controle positivo das reações foram utilizadas amostras de DNA das cepas já mencionadas e os *primers* gênero-específicos 13A/13B (Rodgers et al., 1990). Como controle negativo foram realizadas reações sem DNA.

Com o objetivo de definir parâmetro de positividade, cada par de *primer* testado, os valores de Cts das amplificações das diferentes espécies de *Leishmania* foram comparados com os Cts dos controles positivos. Como os resultados da qPCR (Ct dos controles positivos e amostras) compõem dados não paramétricos, o teste de Wilcoxon foi aplicado e as reações com valores de P menores que 0,0056 (correção de Bonferroni dos valores 0,05 para 9 testes),

foram definidas como negativas (Figura Suplementar 1). Resultados considerados discrepantes à comparação das triplicatas foram excluídos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho utilizou, pela primeira vez, uma abordagem que combina a associação da análise *in silico* (e-PCR) e *in vitro* (qPCR) para a avaliação de *primers* específicos para *Leishmania* spp.. Assim, foi possível a identificação prévia de *primers* específicos, através de análise de dados genômicos à e-PCR, e posterior avaliação por qPCR, para utilização futura em amostras biológicas. A abordagem proposta aumenta consideravelmente o número de sequências-alvo que podem ser analisadas de acordo com a necessidade de cada pesquisa ao mesmo tempo em que diminui o tempo e custo de avaliação da especificidade desejada.

Um conjunto de 116 pares de *primers* espécie, gênero ou complexo-específicos descritos na literatura foi avaliado para a amplificação específica de DNA de *Leishmania* spp.. A avaliação por e-PCR resultou em amplificação específica de 76 pares de *primers* (65,52%), sendo que destes, 16 pares (16,65% do total) resultaram em especificidade de acordo com o que havia sido descrito na literatura. Após a filtragem destes resultados, apenas nove (09) pares de *primers* (7,8% do total) preencheram os critérios de seleção (item 2.1).

Vale ressaltar que aqueles *primers* que especificidade condizente com o descrito na literatura à e-PCR, porém não foram selecionados para a avaliação

por qPCR por não preencherem critérios estabelecidos neste estudo, não devem ser descartados pois podem ser específicos à PCR convencional, por exemplo. Assim como os *primers* ISVA-ISVC (Castilho et al., 2003) que resultaram em amplificação para espécies do subgênero *Viannia*, conforme descrito na literatura porém, o tamanho de fragmento amplificado era maior de 300pb tendo sido, portanto, descartado para a avaliação à qPCR neste estudo. Embora os critérios de seleção fossem necessários para que pudessem ser avaliados à qPCR, limitaram o presente estudo, além disto, a falta de algumas informações genômicas ainda existente nos bancos de dados públicos pode resultar em falsos-positivos ou até mesmo falsos-negativos. Entretanto esta deficiência de dados vem sendo minimizada a cada dia, através do crescente aumento de informações genômicas disponibilizadas em bancos de dados públicos (Akhoundi et al., 2017).

Apesar disso, a e-PCR é uma ferramenta extremamente útil quando se necessita de uma análise prévia às técnicas moleculares, otimizando tempo e recursos financeiros.

Após análise por e-PCR, os *primers* selecionados foram também avaliados por meio da qPCR, conhecida por apresentar alta sensibilidade e especificidade (Galluzzi et al., 2018). Nas reações de qPCR os controles positivos são essenciais para monitoramento da variação dos ensaios, particularmente quando não são realizadas curvas de calibração (Bustin et al., 2009).

Assim, o controle positivo das reações de qPCR baseou-se na amplificação de fragmento de DNA de kinetoplasto (kDNA) de cada cepa de referência testada utilizando-se os *primers* 13A/13B (Rodgers et al., 1990), gênero-específico. Considerando-se a distribuição dos valores de Ct destas reações foi possível observar que os valores de Ct médio das espécies do subgênero *Leishmania* foi cinco vezes menor quando comparado ao das espécies do subgênero *Viannia* (Tabela Suplementar 2).

Os *primers* 13A/13B amplificam fragmento de DNA com elevado número de cópias alvo do kDNA de *Leishmania* spp. (Rodgers et al., 1990). Os alvos kDNA não possuem sequências de DNA idênticas dentro dos organismos, enquadrando-se em diferentes classes de sequências e tendo seu número de sequências dependentes da espécie, sendo este número variável e de aproximadamente 10.000 cópias (Rogers and Wirth, 1987) embora o número exato de cópias para cada uma das espécies seja ainda desconhecido (Weirather et al., 2011). A diferença da distribuição das amplificações observada entre os dois subgêneros pode ser resultante do fato das espécies do subgênero *Leishmania* possuírem maior número de cópias para o fragmento amplificado pelos *primers* 13A/13B em relação às espécies do gênero *Viannia*. Este resultado pode ser futuramente melhor explorado para a diferenciação entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*.

Os nove (09) pares de *primers* específicos à e-PCR que preencheram os critérios de seleção definidos para este estudo foram então testados *in vitro*,

por qPCR, e cinco (05) deles (55,5%) resultaram em ampliações de fragmentos de DNA com a especificidade relatada na literatura (Tabela 1).

Tabela 1 – Especificidade dos *primers* segundo a literatura e os resultados após análise *in silico* (e-PCR) e *in vitro* (qPCR)

<i>Primer</i>	Descrição da literatura	Especificidade à e-PCR	Especificidade à qPCR
ISVB-ISVC*	Espécie-específico (<i>L. braziliensis</i>)	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
11H*	Subgênero-específico (Complexo <i>Viannia</i>)	<i>L. guyanensis</i> ; <i>L. braziliensis</i> ; <i>L. panamensis</i>	<i>L. shawi</i> ; <i>L. braziliensis</i> ; <i>L. guyanensis</i> ; <i>L. panamensis</i>
6F*	Subgênero-específico (Complexo <i>Viannia</i>)	<i>L. shawi</i> ; <i>L. braziliensis</i> ; <i>L. panamensis</i>	<i>L. shawi</i> ; <i>L. braziliensis</i> ; <i>L. guyanensis</i> ; <i>L. panamensis</i>
B6F*	Subgênero-específico (Complexo <i>Viannia</i>)	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. shawi</i> ; <i>L. braziliensis</i> ; <i>L. guyanensis</i> ; <i>L. panamensis</i>
G6PD-LLF/ G6PD-LLR*	Subgênero-específico (Complexo <i>Leishmania</i>)	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i> ; <i>L. amazonensis</i>
b1-b2	Espécie-específico (<i>L. braziliensis</i>)	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. shawi</i>
MLF-MLR	Subgênero-específico (Complexo <i>Leishmania</i> e <i>Viannia</i>)	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. infantum</i> ; <i>L. major</i> ; <i>L. panamensis</i> ; <i>L. tarentolae</i>	<i>L. infantum</i> ; <i>L. major</i> ; <i>L. mexicana</i> ; <i>L. shawi</i> ; <i>L. braziliensis</i> ; <i>L. guyanensis</i> ; <i>L. panamensis</i> ; <i>L. chagasi</i>
LEISH1/ LEISH2	Espécie-específico (<i>L. infantum</i>)	<i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> ; <i>L. infantum</i> ; <i>L. mexicana</i> ; <i>L. shawi</i> ; <i>L. guyanensis</i> ; <i>L. chagasi</i>
Mary-f/ Mary-r	Espécie-específico (<i>L. infantum</i>)	<i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> ; <i>L. infantum</i> ; <i>L. mexicana</i> ; <i>L. shawi</i> ; <i>L. braziliensis</i> ; <i>L. guyanensis</i> ; <i>L. panamensis</i> ; <i>L. chagasi</i>

**Primers* que resultaram em especificidade para espécie, complexo ou subgênero.

Os *primers* ISVB-ISVC foram específicos, tanto *in silico* quanto *in vitro*, para a espécie *L. braziliensis*; os *primers* 11H, 6F e B6F também mantiveram a especificidade relatada para espécies do subgênero *Viannia*, corroborando com o descrito na literatura (Castilho et al., 2003; Oddone et al., 2009).

Já os *primers* G6PD-LLF/ G6PD-LLR, anteriormente citados como específicos para o subgênero *Leishmania* (Castilho et al., 2008), apresentaram especificidade para o complexo *L. mexicana*, com amplificação de fragmento de DNA apenas com DNA das espécies *L. mexicana* e *L. amazonensis*, dentre as avaliadas neste trabalho.

Os *primers* b1-b2 resultaram em amplificação de DNA específica para a espécie *L. braziliensis* à qPCR, de acordo com o resultado previamente publicado (Mimori et al., 1998). Entretanto, o resultado da amplificação de fragmento de DNA de *L. shawi* não foi considerado estatisticamente diferente ao de *L. braziliensis* em nossa análise (teste de Wilcoxon). Como *L. shawi* é também uma das espécies pertencentes ao subgênero *Viannia*, o referido par de *primer* não foi considerado espécie-específico e sim subgênero-específico.

Nossos resultados de amplificação de fragmento de DNA com os *primers* MLF-MLR (Ceccarelli et al., 2014) também não permitiram a diferenciação entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* à e-PCR ou à qPCR, mesmo tendo realizado a análise da curva de dissociação. Porém, Ceccarelli et al. (2014) também relataram que estes *primers* resultavam em diferenciação dos subgêneros quando a amplificação foi seguida da análise da curva de dissociação em alta resolução (HRM- *high resolution melting*). Sendo assim,

podemos sugerir o uso de tais *primers* para análises gênero-específicas à qPCR.

O resultado da aplicação com os *primers* LEISH1-LEISH2 (Francino et al., 2006), citados como específicos para região conservada de kDNA de *L. infantum*, resultou em confirmação desta especificidade à e-PCR. Porém, a aplicação destes *primers* à qPCR resultaram em amplificação de DNA das espécies *L. chagasi*, *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana*, além da *L. guyanensis* e *L. shawi*. Padrão similar de resultado à qPCR foi observado com os *primers* Mary-f/ Mary-r (Mary et al., 2004), citados como específicos para *L. infantum* e que também resultaram em amplificação de DNA de outras espécies pertencentes aos dois subgêneros (Tabela 1). Esta inespecificidade observada no presente trabalho corrobora com a observado por Ceccarelli et al. (2014), que ao avaliarem estes mesmos *primers* observaram amplificação de fragmento de DNA das espécies *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. braziliensis*, além de *L. infantum*.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a eficiência da associação de análises *in silico* previamente às análises *in vitro*, uma vez que possibilitou identificar de forma ágil e sem custo adicional, quando comparados o tempo e os recursos que seriam necessários para se testar apenas *in vitro*, inespecificidade para a maior parte dos *primers* selecionados de acordo com o relatado na literatura. Entretanto, divergências nos resultados obtidos entre as análises *in silico* e *in vitro*, como por exemplo, a especificidade à e-PCR dos *primers* desenhados para *L. infantum*, e a inespecificidade destes mesmos

primers quando testados à qPCR, ainda são passíveis de ocorrência possivelmente devido à lacunas nas filtragens, à falta de informação genômica, ou mesmo à informações genéticas errôneas das espécies em questão depositadas nos bancos de dados. Felizmente, esta deficiência vem sendo minimizada a cada dia, através do crescente aumento de informações genômicas disponibilizadas em bancos de dados públicos (Akhoundi et al., 2017).

4. CONCLUSÕES

A utilização da análise *in silico*, por meio da e-PCR, mostrou eficiência suficiente para a seleção prévia de *primers*, seguida de avaliação *in vitro*, por qPCR, minimizando custo e tempo necessários para a diferenciação entre subgêneros, complexo e espécies de *Leishmania*.

Como o volume de informações genômicas cresce a cada dia, esta metodologia é altamente recomendada para a otimização de análises moleculares para o diagnóstico das leishmanioses.

Agradecimentos

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de mestrado; à FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz) e aos grupos de pesquisa liderados pela Dra. Valéria Marçal Felix de Lima da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (Unesp), Dr. José Ângelo Lauletta Lindoso, Dra. Kelly Kanunfre e Mestre Edite Hatsumi Kanashiro do

Instituto de Medicina Tropical (USP), Dra. Vânia da Matta da Faculdade de Medicina (USP) pelas amostras de referência cedidas para o experimento.

REFERÊNCIAS

Akhoundi, M.; Hajjaran, H.; Baghaei, A.; Mohebbali, M., 2013. Geographical distribution of *Leishmania* species of human cutaneous leishmaniasis in Fars Province, Southern Iran. *Iranian J Parasitol.* 8, 85–91.

Akhoundi, M.; Downing, T.; Votýpka, J.; Kuhls, K.; Lukes, J.; Cannet, A.; Ravel, C.; Marty, P.; Delaunay, P.; Kasbari, M.; Granouillac, B.; Gradoni, L.; Denis, S., 2017. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol. Aspects Med.* 57, 1-29.

Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellenmans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Shipley, G.L.; Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611-622.

Cantacessi, C.; Dantas-Torres, F.; Nolan, M.J.; Otranto, D. 2015. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends Parasitol.* 31, 100–108.

Castilho, T.M.; Shaw, J.J.; Floeter-winter, L.M. 2003. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J. Clin. Microbiol.* 41, 540–6.

Castilho, T.M.; Camargo, L.M.A.; McMahon-Pratt, D.; Shaw, J.J.; Floeter-Winter, L.M. 2008. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate-dehydrogenase. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 122-132.

Ceccarelli, M.; Galluzzi, L.; Migliazzo, A.; Magnani, M. 2014. Detection and characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. *PLoS ONE*. 9, e88845.

Conter, C.C.; Lonardoni, M.V.C.; Aristides, S.M.A.; Cardoso, R.F; Silveira, T.G.V. 2018. New *primers* for the detection *Leishmania* species by multiplex polymerase chain reaction. *Parasitol. Res.* 117, 501-511.

De Morais, R.C.S.; Da Costa Oliveira, C.N.; De Albuquerque, S.C.; Silva, L.A.M.T.; Pessoa-e-Silva, R.; Cruz, H.L.A.; Brito, M.E.F.; Cavalcanti, M.P. 2016. Real-time PCR for *Leishmania* species identification: Evaluation and comparison with classical techniques. *Exp. Parasitol.* 165, 43-50.

Francino, O.; Altet, L.; Sánchez-Robert, E.; Rodriguez, A.; Solano-Gallego, L.; Alberola, J.; Ferrer, L.; Sánchez, A.; Roura, X. 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitorin of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 137, 214-21.

Galluzzi, L.; Ceccarelli, M.; Diotallevi, A.; Magnani, M. 2018. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasit. Vectors.* 11, 273-86.

Ivens, A.C.; Peacock, C.S.; Worthey, E.A.; Murphy, L.; Aggarwal, G.; Berriman, M.; Sisk, E.; Rajandream, M.A.; Adlem, E.; Aert, R. et al. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 309, 436–442.

Kuhls, K.; Keilonat, L.; Ochsenreither, S.; Schaar, M.; Scweynoch, C.; Presber, W.; Schonian, G. 2007. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes Infect.* 9, 334–343.

Mary, C.; Faraut, F.; Lascombe, L.; Dumon, H. 2004. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR assay with high sensitivity. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5249-5255.

Medley, G.F.; Hollingsworth, T.D; Olliaro, P.L.; Adams, E.R. 2015. Health-seeking behaviour, diagnostics and transmission dynamics in the control of visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. *Nature*. 528, S102–S108.

Mimori, T.; Sasaki, J.I.; Nakata, M.; Gomez, E.A.; Uezato, H.; Nonaka, S.; Hashiguchi, Y.; Furuya, M.; Saya, H. 1998. Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. *Gene*. 210, 179–86.

Oddone, R.; Schweynoch, C.; Schonian, G.; Sousa, C.S.; Cupolillo, E.; Espinosa, D.; Arevalo, J.; Noyes, H.; Mauricio, I.; Kuhls, K. 2009. Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania (Viannia)* species. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2818–2825.

Ochsenreither, S.; Kuhls, K.; Schaar, M.; Presber, W.; Schonian, G. 2006. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. J. Clin. Microbiol. 44, 495–503.

R, Core Team. R: A language and environment for statistical computing. 2013. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.

Rogers, W.O; Wirth, D.F. 1987. Kinetoplast DNA minicircles: Regions of extensive sequence divergences. Proc. Natl. Acad. USA. 84, 565-569.

Rodgers, M.R.; Popper, S.J.; Wirth, D.F. 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. Exp. Parasitol. 71, 267-275.

Schönian, G.; Kuhls, K.; Mauricio, I. L. 2011. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. Parasitol. 138, 405–425.

Schriefer, A.; Wilson, M. E.; Carvalho, E. M. 2008. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. Curr. Opin. Infect. Dis. 21, 483–488.

Schuler, G.D. 1997. Sequence mapping by electronic PCR. Genome Res. 7, 541-550.

Schulz, A.; Mellenthin, K.; Schonian, G.; Fleischer, B.; Drosten, C. 2003. Detection, differentiation, and quantification of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1529-1535.

Tsokana, C.N.; Athanasiou, L.V.; Valiakos, G.; Spyrou, V.; Manolakou, K.; Billinis, C. 2014. Molecular diagnosis of leishmaniasis, species identification and phylogenetic analysis. In: CLABORN, D. *Leishmaniasis: Trends in epidemiology, diagnosis and treatment*. Intech Open, 161-193.

Weirather, J.L.; Jeronimo, S.M.B.; Gautam, S.; Sundar, S.; Kang, M.; Kurtz, M.A.; Haque, R.; Schriefer, A.; Talhari, S.; Carvalho, E.M.; Donelson, J.E.; Wilson, M.E. 2011. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3892-3904.

WHO - World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

APÊNDICE(S)

Tabela Suplementar 1 – Oligonucleotídeos iniciadores disponíveis na literatura para diferenciação de espécies de *Leishmania* selecionados para o estudo.

<i>Primers</i>	Forward	Reverse	Referências	Especificidade
10F	TGCGAGTATACCTCTCCTTCA	CAACAACAACAACCGAGAGG	Oddone, 2009	Subgenus-specific
11C	GTGGGTATGCGTGTGTCTCT	ATTAAGTTGCCACCCTCAC	Oddone, 2009	Subgenus-specific
11H	CACACCTGCTACTGGTCCTC	TCTGTTTCATGACATGCCTTT	Oddone, 2009	Subgenus-specific
6F	CAACAGCAAAGCACAAAGAA	CAGCAATGCCGATAAGAAAC	Oddone, 2009	Subgenus-specific
6PGD.1262.F/.R	CAAGGAGATGAAGGAGGGTC	CTTGTC AACACGTTTCGTAGC	Tsukayama et al., 2013	Complex-specific
6PGDextF/R	CACCAGTCCGCTCCCT	GCCTCTGTATTTACGCTTC	Tsukayama et al., 2009	Species-specific
6PGDintF/R	TTCAAGGCGTTCCTACATT	ACTCGCCAGCGTTGTGATA	Tsukayama et al., 2009	Species-specific
7GN	CTCCTGGAACGGCTAACAC	TGATATGAGGCACATTCAGC	Oddone, 2009	Subgenus-specific
A1/A2	TGCGAGGATAAAGGGAAAGAA	GTGCCCTGACTTGCATGTCTA	Mimori et al., 1998	Species-specific
AC01R	ACGTCAGCACACAAACGTC	CTTCTTCCTGCTTTGCCTCT	Oddone, 2009	Subgenus-specific
AC16RF/R	GGGTGTCGAGGATGAGGT	TAGTGCCATTAGGGGCTCA	Oddone, 2009	Subgenus-specific
B1/B2-Bruijn&Barker	GGGGTTGGTGAATATA GTGG	CTAATTGTGCACGGGGAGG	De Bruijn and Barker, 1992	Complex-specific
b1-b2 Mimori	GTGGGCGTATCTGCTGATGAC	CAAAAAGCGAGGGACTGCGGA	Mimori et al., 1998	Species-specific
B3H	GGTATGCGTGGATATGAAGC	CTCGGCATCGCAGTTTC	Oddone, 2009	Subgenus-specific
B6F	CACCTCTTGCCTGCACTT	TTTAAACGTCGGTCTGTGTG	Oddone, 2009	Subgenus-specific
BPKDNAMIN	CTGGGGGTTGGTGTAAAATAGGGC	CCCGATTTTTGGCATT TTTT GG	Bhattarai et al., 2010	Species-specific
cpbF2.1/Do2.1	GCGGCGTGATGACCAGC	CAATAACCAGCCATTCGTTTTTA	Laurent et al., 2009	Species-specific
CPBFOR/ REV	CGAACTTCGAGCGCAACCT	CAGCCCAGGACCAAAGCAA	Tintaya et al., 2004	Complex-specific
CSg46	AAACGTGCAAAGGCACATC	TCTATTACCGCGCTCATGCT	Oddone, 2009	Subgenus-specific
CSg47	GTGTTCTGTAAACGTCGAAA	AAAAGGCCGGTTTCAAATTC	Oddone, 2009	Subgenus-specific
CSg48	TTGACGTGTACACCGCTCTT	TTCTGAGAAAGGCAACCGATA	Oddone, 2009	Subgenus-specific

CSg53	CATGTAGGCATGCGGTTGTA	GCTCCTTTTCTCGTTTGAAC	Oddone, 2009	Subgenus-specific
CSg55	GCTTTGCTTGGACTGGAGAG	GGAGGGAAAAGGAAGTCCAG	Oddone, 2009	Subgenus-specific
CSg59	CATTTGAGCTGCACGTGTCT	AGGGGAGAGTGTGTTTGGTG	Oddone, 2009	Subgenus-specific
F1/R2	GAACGAATCCCTTATTCTCYATG	GGAACCGGTTGAGCGGC	Mauricio, 2006	Complex-specific
F1/R3	CTTGCTTACGCCGCAGA TAC	GAAAAAAAAGACGCTTCACACA AGC	Mauricio, 2006	Complex-specific
F10/R6	ACGTGGGCGAACGCAC	GCCATCTACACCTTCAGTGCCT CGGTC	Mauricio, 2006	Complex-specific
F2new/R2new	ACGAGCGCCGTCCGYAA	TTCCYMCATCCACCAAGC	Mauricio, 2006	Complex-specific
F3/R4	GAATCCCTTTTCAAGATGAGCG ATTAT	CCCCTGAGAGGCAATCACAG	Mauricio, 2006	Complex-specific
FerreiraPrimer1	TGTCGCTTGCAGACCAGATG	GCATCGCAGGTGTGAGCAC	Ferreira et al., 2012	Species-specific
FLC2/RLC2	GTCAGTGTGGAAACTAATCCGC	GGGAAATTGGCCTCCCTGAG	Gualda et al., 2015	Species-specific
g6pdhPrimer	ATGTCCGAAGAGCAGTCT	TCACAGCTTATTCGAGGGAA	Zemanova, 2007	Complex-specific
G6PD-LLF/ G6PD-LLR	CTTGTTGCCTCCGGCTAC	GGCCATGTAAGCATCCT CAT	Castilho et al., 2008	Subgenus-specific
G6PD-LVF/ G6PD-LVR	TTGATCACTGGTACATGCATTAAG	CTCGTCCAGAATGCAGC AC	Castilho et al., 2008	Subgenus-specific
GAPD-F/GAPD-R	GTGGGCAAGGTCATC	CTGCTTACCACCTTCTT GAT	Castilho et al., 2008	Subgenus-specific
GPlexF/R	AATGTTCTTCATACCCCTCT	TTCCGTCCGTCTCCTG	Tsukayama et al., 2009	Species-specific
GPIntF/R	TGGGATTGGCGGCAGCGACCTT	CGCCACAGGTAAGTGGTTCGT	Tsukayama et al., 2009	Species-specific
HSP70F/R1310	GTGCACGACGTGGTGCTGG TG	CCTGGTTGTTGTTTCAGCC ACTC	Auwera, 2013	Family-specific
hsp70F1/R1	AGCGCATGGTGAACGATGCGTC	CTTCATCGAGTACGCGTAGTTCTCC	Zampieri et al., 2016	Complex-specific
hsp70F2/CRv	GGAGAACTACGCGTACTCGATGAAG	TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG	Zampieri et al., 2016	Complex-specific
HSP70F25/R1310	GGACGCCGGCACGATTKCT	CCTGGTTGTTGTTTCAGCCA CTC	Auwera, 2013	Family-specific
HSP70F25/R617	GGACGCCGGCACGATTKCT	CGAAGAAGTCCGATACGA GGGA	Auwera, 2013	Family-specific
icdPrimer	ATGTTCCGCCATGTTTCGGC	TTACGCGCTCATCGCCTT	Zemanova, 2007	Complex-specific
infcpbE/Inf2.1	GTCTTACCAGAGCGGAGTGCTACT	ATAACCAGCCATTCCGGTTTTG	Laurent et al., 2009	Species-specific

IR1/LM15	GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGC TGGATCATT	CTCTCCTCCCTCGCTTGTC	Cupolillo et al., 1995; Berunza-Cruz et al., 2009	Species-specific
IR1/LM17	GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGC TGGATCATT	CCCCTCTCCTCCTCCCC	Cupolillo et al., 1995; Berunza-Cruz et al., 2009	Species-specific
ISVA-ISVCr	GTCGGTTATCCTATTCGG GTC	ATCACAATGATGGTCAAC GCAC	Castilho et al., 2003	Subgenus-specific
ISVB-ISVC	TACTCGCCATGTCGGAGG	ATCACAATGATGGTCAAC GCAC	Castilho et al., 2003	Species-specific
ITS1f/ITS1r	GTAACAAGGTAGCTGT	TTCTACTGTATGTTGT	Cavalcanti et al., 2013	Species-specific
kDNAf/kDNAr1	ATGCCTCTGGGTAGGGGCGTTC	GGGAGCGCGGCCCACTAT ATT	Cavalcanti et al., 2013	Species-specific
kDNAf/kDNAr2	ATGCCTCTGGGTAGGGGCGTTC	GGGTGCGCGGCCCACTAT ATT	Cavalcanti et al., 2013	Species-specific
KMP-11	GATCCCCACGTACGAGGAG	AAGCTTGTGGTCCTGATCTAA	Matos et al., 2010	Species-specific
L.(L.)amazonensis DNApolymerase1	GACGACGACGAGGAGGATGG	GCGACGGGTACAGGGAGTTG	Weirather et al., 2011	Species-specific
L.(V.)braziliensis kDNA1	AATTTTCGAGAACGCCCTAC	GTA TCTCCCCGACATGCCTCTG	Weirather et al., 2011	Species-specific
L.(L.)amazonensis cytochromeB1	GCGGAGAGGAAAGAAAAGGCTTA	AAAAGTCATGCTAAACACAC ACCACA	Weirather et al., 2011	Species-specific
L.(L.)amazonensis kDNA1	GGTCCCGGCCCAAACCTTTTC	CCGGGGTTTCGCACTCATTT	Weirather et al., 2011	Species-specific
L.(L.)amazonensis kDNA2	GGTAGGGGCGTTCTGCGAAT	CCCGGCCTATTTTACACCAACC	Weirather et al., 2011	Species-specific
L.(L.)amazonensis kDNA3	GGGTAGGGGCGTTCTGC	TACACCAACCCCCAGTTTGC	Weirather et al., 2011	Species-specific
L.(L.)amazonensis kDNA4	TGAGTGCAGAAACCCCGTTCATA	ACACCAACCCCCAGTTGTGA	Weirather et al., 2011	Species-specific
L.(L.)majorminicircle1	ACGGGGTTTCTGCACCCATT	GTAGGGGCGTTCTGCGAAAA	Weirather et al., 2011	Species-specific
L.(L.)mexicanaminicircle1	AATGCGAGTGTTGCCCTTTTG	GCCGAACAACGCCATATTAACC	Weirather et al., 2011	Species-specific
L.(L.)tropica cytochromeB1	CAGGTTGCTTACTACGTGTTT ATGGTG	TCGTATTACAAACCCTAAATC AAAATCTCA	Weirather et al., 2011	Species-specific
L.(L.)tropica cytochromeB2	TCAGGTTGCTTACTACGTGTTT ATGGTG	TGCTAAACAAACACCACATA TGATCTGC	Weirather et al., 2011	Species-specific

L.(L.)tropicalis cytochromeB3	TGACACACATATTTTAGTGTGG GTGGTAGG	TCCCAATAAGACATCATTGT ACATGGTAA	Weirather et al., 2011	Species-specific
L.(L.)tropicacytochromeB4	CACATATTTTAGTGTGGGTGG TAGGTTTTG	TCCCAATAAGACATCATTGT ACATGGTAA	Weirather et al., 2011	Species-specific
L.(V.)braziliensis DNAPolymerase1	TCGTTGAGGGAGGAGGTGTTTC	TCGGCTTTGAGGTTGGCTTC	Weirather et al., 2011	Species-specific
L.(V.)braziliensis DNAPolymerase2	ACGTCGCCAACTGCTTCACC	GTGTTGCGACCGCCTTGAC	Weirather et al., 2011	Species-specific
L.ITS.F/L.ITS.R	CAAATACACGCATGCA CTCTC	TTAATAATCCTGGTCACAGCC	Dabiri et al., 2014	species-specific
L.majorMAG1	GTGTTGTCCGTGTGCTGT	CGCTGTGTGTCCGTGTGT	Weirather et al., 2011	Species-specific
L1/L2	GGTCACTCGGCATTTTTGC	GTGCCCTGACTTGCATGTCTA	Mimori et al., 1998	Subgenus-specific
Lch14/Lch15	CGCACGTTATATCTACAGGTTGAG	TGTTTGGGATTGAGGTAATAGTGA	Silva et al., 2016	Species-specific
LCS-1/LCS-3	GCAATGCCAGCTACATATATG	CAGCTTTTTGGGTGGGTAACA	Neto et al., 2012	Species-specific
LCS-2/LCS-3	GTAGGGGTGAAGGGCGGTG	CAGCTTTTTGGGTGGGTAACA	Neto et al., 2012	Species-specific
Lei70L/R	CGCAACCTCGGTTCCGGTGTG	CGCGGTGCTGGACACAGGGTA	Spanakos et al., 2002	Species-specific
LEIF-LEIR	AAGGTCAAAGAACAAGGCCAAG	GCATCGGAGTCGG	Solcà et al., 2012	Species-specific
LEISH1-LEISH2	AACTTTTCTGGTCTCCGGGTAG	ACCCCGAGTTTCCCGCC	Francino et al., 2006	Species-specific
Lid-f/Lid-r	CCAGATGCCGACCAAAGC	CGCGCACGTGATGGATAAC	Wortmann et al., 2005	complex-specific
LinJ31FW/RV	CCGCGTGCCTGTGCG	CCCACACAAGCGGGA	Colombo et al., 2015	Subgenus-specific
LITSR/ITS1R-TR1	CTGGATCATTTTCCGATG	GAAGCCAAGTCATCCATCGC	Toz et al., 2013	Complex-specific
LITSR-L5.8SR	CTGGATCATTTTCCGATG	TGATACCACTTATCGCACTT	El Tai et al., 2000	Complex-specific
LM9/LV2	GGACGAGCTCATGGCGCC	CAATGCAGTCATCCTTTC	Berzunza-Cruz et al., 2009	Complex-specific
Lmaj-f/Lmaj-r	TTCTGCTCCGTCCGGTGTAGA	GCTTTCGATTGGCTACGACAA	Wortmann et al., 2005	Complex-specific
Lm-f/Lm-r	CCAGTCCCAGAACACAAACATG	CCTATCGACCAACACAGA AAAGG	Wortmann et al., 2005	Complex-specific
LSGITS1-F1/ LSGITS1-R1	CATTTTCCGATGATTACAC	CGTTATGTGAGCCGTTATC	Almeida et al., 2016	Subgenus-specific
LSPF/LLAR	GGGTAGGGGCGTTCTG	CCCCAGTTGTGACCG	Conter et al., 2018	Species-specific

LSPF/LLCR	GGGTAGGGGCGTTCTG	CCGATTTTTGAACGGGA	Conter et al., 2018	Complex-specific
LSPF/LVBR	GGGTAGGGGCGTTCTG	GCGCGGCCCACTATA	Conter et al., 2018	Subgenus-specific
LU-5A/LB-3C	TTTATTGGTATGCGAACTTC	CGT(C/G)CCGAACCCCGTGTC	Harris et al., 1998	Complex-specific
LU-5A/LC-3L	TTTATTGGTATGCGAACTTC	GCCCGCG(C/T)GTCACCACCAT	Harris et al., 1998	Complex-specific
LU-5A/LM-3A	TTTATTGGTATGCGAACTTC	GCACCGCACCGG(A/G)CCAC	Harris et al., 1998	Complex-specific
LV-f/LV-r	CAACAAAATGCTTCGCAACAG	CGCAACGCCTTCATGGA	Wortmann et al., 2005	Complex-specific
M1/M2 Primer	CCAGTTTCGAGCCCCGGAG	GGTGTAATAAGGGGCGGA TGCTCTG	Eresh et al., 1994	Complex-specific
Mary-f/Mary-r	CTTTTCTGGTCTCCGGGTAGG	CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA	Mary et al., 2004	Species-specific
MATRAE2/Ae2.1	GGCGATGGTGGAGCAGATGATCT	AGTACGTGCACATCA GCACATGGG	Laurent et al., 2009	Species-specific
MATRAE2/Ma4.1	GGCGATGGTGGAGCAGATGATCT	CGGTTCTCGTAGCACACTTGTTG	Laurent et al., 2009	Species-specific
MATRAE2/Tr4.1	GGCGATGGTGGAGCAGATGATCT	CTCCCCCGTTCCGGAT	Laurent et al., 2009	Species-specific
MC1-MC2 Primer	GTTAGCCGATGGTGGTCTTG	CACCCATTTTTCCGATTTTG	Cortes et al., 2004	Species-specific
MDHextF/R	TCACAACCGCAACTACGA	CTACTCACGATAACGGCAGA	Tsukayama et al., 2009	Species-specific
MDHintF/R	GCCGCCAACGACAGGGAC	GCCGCCAACGACAGGGAC	Tsukayama et al., 2009	Species-specific
MLF-MLR	CGTTCTGCGAAAACCGAAA	CGGCCCTATTTTACACCA ACC	Ceccarelli et al., 2014	Subgenus-specific
MPI.1082.F/R	ACGCCAAGTGAAGGATG	ACACCACTGTACCGTTCACC	Tsukayama et al., 2013	Complex-specific
MPIextF/R	CCCTTTGGTTGTCGGT	TCATACGCATAGGAGCA	Tsukayama et al., 2009	Species-specific
MPIintF/R	TTTACAAGCAGTACCCCGATGA	GGCTGCATACCAGGTTTCGTCATC	Tsukayama et al., 2009	Species-specific
mpiPrimer	ATGTCTGAGCTCGTAAAGCT	CTACCTGTGCTCAAGTC	Zemanova, 2007	Complex-specific
NADP-malicenzyme F/R	CGCAACCGCTTCACCAATAAGGGC	CAACTCCTTCTCCAGGTAGTAGTT	Zemanova, 2007	Complex-specific
P299F/R	AGCGGAAAGGCAGATGCGTAGG AGC	CGCCGTGTTGTTGCTGTTT GAGT CG	Choudhury et al., 2008	Species-specific
PassosF/PassosR	GGCCCACTATATTACACCAACCCC	GGGGTAGGGGCGTTCTGCGAA	Passos et al., 1996. In: Pita-Pereira et al., 2012	Subgenus-specific
PIGS1A/ PIGS2B	CCTCATTGCTTTGGTCTGG	GGCGTGCCACGTATATCGC	Tintaya et al., 2004	Complex-specific
rRNA-YangPrimer	AGCAGGTCTGTGATGCTCCT	GGACGTAATCGGCACAGTTT	Yang et al., 2007	Species-specific

RV1-RV2-Primer	CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG	CCACCTGGCCTATTTTACACCA	Le Fichoux et al., 1999	Species-specific
S4-S12	GATCCAGCTGCAGGTTCCACC	GGTTGATTCCGTCAACGGAC	Uliana et al., 1994	Species-specific
SHERPF- SHERPR	GGACCAGATGAACAACGCCGCGG	ACGAGCCGCCGCTTATCTTGTC	Moreira et al., 2014	Species-specific
SLACS	GGAGAAACTCACGGCACAGG	GCGCCTCGTAGGTCACAGTT	Weirather et al., 2011	species-specific
SSUrDNAf/ SSUrDNAr	CGACAAGCGCTCTCCC	CCCAGTACGTTCTCCC	Cavalcanti et al., 2013	Species-specific
V1/V2	GCTTCTCGTTTCGCTTTGAAC	CAAGACAAGAAAAAGGCGGC	Mimori et al., 1998	Subgenus-specific
WSSUF- WSSUR	GCTTGTTCAAGGACTTAGCC	GAAATATCGGTGAACTTTCGG	Noyes et al., 1997	Complex-specific

Tabela Suplementar 2 – Valores médios de Ct observados à amplificação de fragmentos de kDNA de espécies de *Leishmania*, por qPCR, utilizando-se os *primers* 13A/13B (Rodgers et al., 1990)

Espécies	Ct médio
<i>L. chagasi</i>	1,65
<i>L. amazonensis</i>	2,34
<i>L. mexicana</i>	2,88
<i>L. major</i>	6,33
<i>L. infantum</i>	8,72
<i>L. shawi</i>	20,36
<i>L. guyanensis</i>	24,13
<i>L. panamensis</i>	25,76
<i>L. braziliensis</i>	26,63

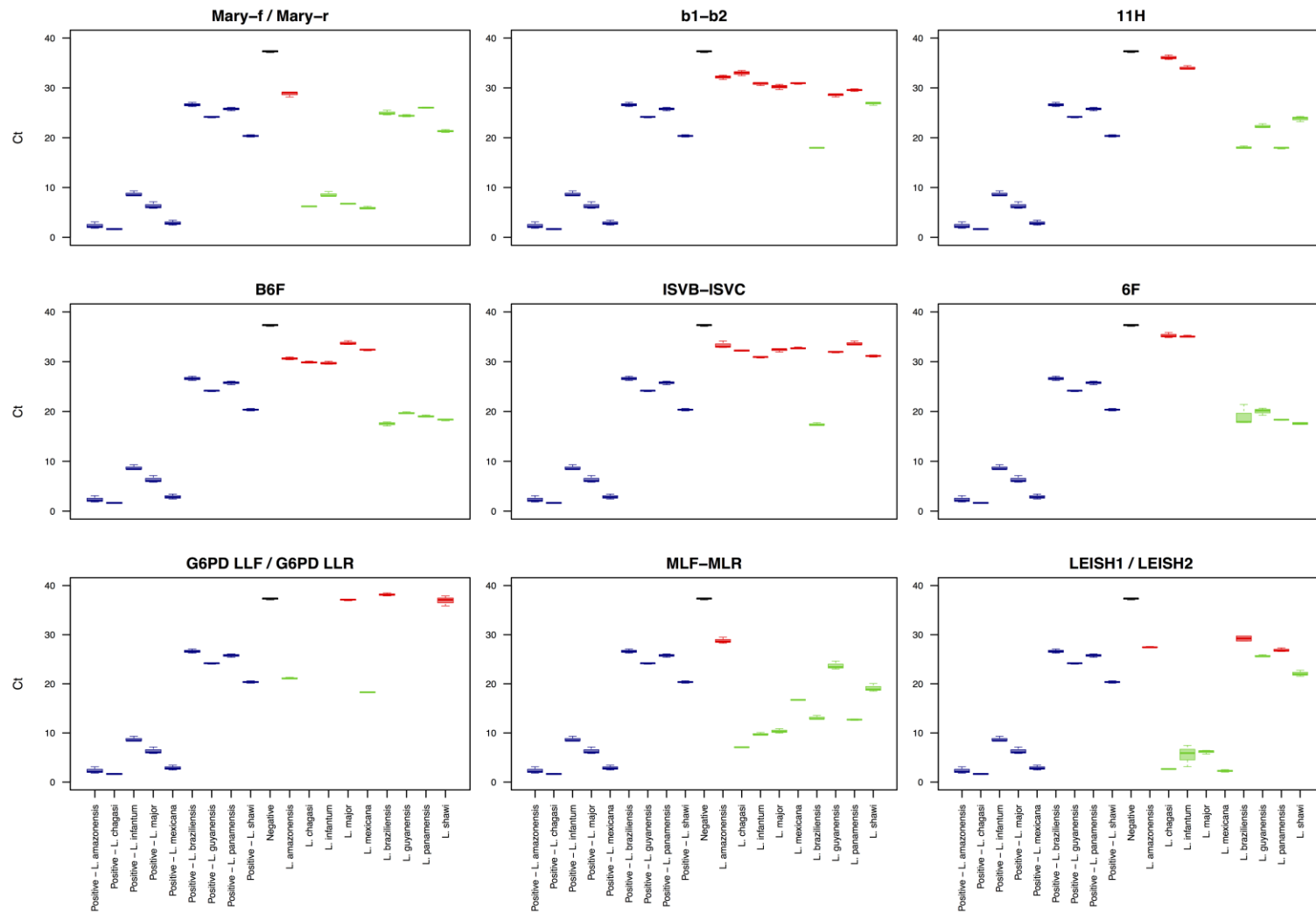


Figura Suplementar 1 – Boxplot das amplificações por qPCR de fragmento de DNA de *Leishmania* spp. de acordo com os valores de Ct. Controles positivos representados em azul, controles negativos representados em preto, amostras consideradas positivas em verde, e negativas em vermelho.