



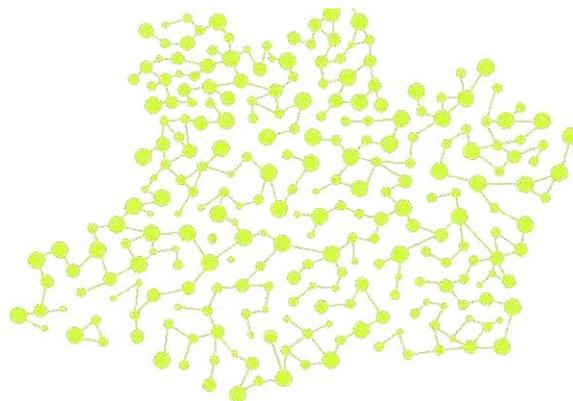
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS



**INVESTIGAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE ESPÉCIES DE *Leishmania* DE BAIXA
CIRCULAÇÃO EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AUTOCTONES DO AMAZONAS**

DENISON VITAL DE JESUS

MANAUS
2023



DENISON VITAL DE JESUS

**INVESTIGAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE ESPÉCIES DE *Leishmania* DE BAIXA
CIRCULAÇÃO EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AUTOCTONES DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção do grau de *Mestre em Doenças Tropicais e Infeciosas*.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra

Co-orientadores: Prof^a. Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra

Dr. Felipe Jules de Araújo Santos

MANAUS

2023

FICHA CATALOGÁFICA

D396ii Jesus, Denison Vital de

INVESTIGAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* DE BAIXA CIRCULAÇÃO EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AUTÓCTONES DO AMAZONAS/ Denison Vital de Jesus. Manaus : [s.n], 2023.
104 f.: color.; 4 cm.

Dissertação - PPSS – Doenças Tropicais e Infecciosas (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.

Inclui bibliografia

Orientador: Guerra, Jorge Augusto de Oliveira

Coorientador: Guerra, Maria das Graças Vale Barbosa e Santos, Felipe Jules de Araújo

1. Leishmaniose humana. 2. Caracterização de espécies de *Leishmania*. 3. Espécies de baixa circulação.

I. Guerra, Jorge Augusto de Oliveira (Orient.).

II. Guerra, Maria das Graças Vale Barbosa (Coorient.).

III. Santos, Felipe Jules de Araújo (Coorient.).

IV. Universidade do Estado do Amazonas.

V. INVESTIGAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* DE BAIXA CIRCULAÇÃO EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AUTÓCTONES DO AMAZONAS

FOLHA DE JULGAMENTO**INVESTIGAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE ESPÉCIES DE *Leishmania*
DE BAIXA CIRCULAÇÃO EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AUTOCTONES DO AMAZONAS****DENISON VITAL DE JESUS**

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Presidente

Membro

Membro

DEDICATÓRIA

À minha mãe Maria Elida Vital Arágua que não mediu esforços para que eu concluísse a graduação e a pós-graduação. Sem dúvidas não teria conseguido concluir este trabalho sem os seus conselhos, apoio e sustentação.

À minha família que mesmo de longe me ofereceu todo apoio e motivação, em especial ao meu avô João Carlos Arágua que no ano passado infelizmente partiu para junto dos braços do criador, deixando muita saudade. Seus exemplos e ensinamentos levarei por toda vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por me fortalecer em momentos difíceis para que conseguisse chegar ao fim desse desafio, pois sem suas bênçãos diárias nada seria possível.

Ao Prof. Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra, por ter aceitado a orientação deste trabalho, pela paciência e por todos os ensinamentos oferecidos durante todo esse processo.

À Prof^a Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra, minha co-orientadora, pelo acolhimento ao grupo de pesquisa em Doença de Chagas e Leishmaniose, pela disposição em orientar e contribuir para o melhoramento do projeto.

Ao Dr. Felipe Jules de Araújo Santos, meu co-orientador, pelos ensinamentos na área molecular e pela condução acurada desse projeto.

A todo Grupo de Pesquisa em Doença de Chagas e Leishmaniose, pelas contribuições diretas e indiretas na execução do trabalho.

A todos os funcionários do centro de entomologia, em especial Yolanda Noguth, Maria Auxiliadora, Claudemir pelo auxílio na execução do projeto.

À MSc. Arineia Soares da Silva, pela amizade e pelos primeiros ensinamentos nos processos de identificação de *Leishmania*.

Aos meus amigos, Matheus Martins, Emily de Sousa, Susan Smith, Jessica Ortiz, Debora Raysa, Suzan Simões, Izabele Guimarães e Laylah Kelre pela motivação e por todos os momentos de descontração.

À Dra. Luciana Mandes, Dra. Melissa de Souza e Dra. Silmara Pennini pela colaboração e compartilhamento de informações necessárias para realização desse trabalho.

Aos profissionais do Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Hospitalar Alfredo da Matta (FUHAM), Dr. André Luiz Letoriundo, Dra. Cintia Mara, MSc. Cynthia Ferreira e MSc. Camila Gurgel por todo o suporte na parte molecular essencial para execução do projeto.

Aos alunos de iniciação científica e apoiadores técnicos do Laboratório de Biologia Molecular da FUHAM, Tamires Pinheiro, Katherine, Michele, Vitoria Maria, Brena Lavine, Rodrigo Aguiar, Guilherme Caldas e Jaqueline Aguiar pelo auxílio na realização dos ensaios moleculares.

À Secretaria do Programa de Pós-Graduação, Altariza Freitas, Jordania Dantas e Joás Góis pela disposição em ajudar nos assuntos da pós-graduação.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da Bolsa.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA), pela oportunidade na formação acadêmica.

À Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, pela estrutura e apoio no desenvolvimento de trabalhos científicos.

À Fundação Hospitalar Alfredo da Matta, em especial ao laboratório de Biologia Molecular por ter cedido o espaço para a realização dos experimentos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este projeto fosse executado com êxito, meus sinceros agradecimentos.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo financiamento desta pesquisa.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma antropozoonose de alta endemicidade e um importante problema de saúde pública na região Amazônica. No estado do Amazonas, já foi registrada a ocorrência de seis espécies de *Leishmania* causadoras de doença em humanos. Entretanto, informações sobre a frequência de espécies de baixa circulação e os aspectos clínicos não têm sido muito observados. O presente estudo teve por objetivo investigar a ocorrência de espécies de *Leishmania* de baixa circulação em casos de leishmaniose tegumentar, autóctones do Amazonas. Foram analisadas amostras de tecido obtidos por biópsia cutânea e *imprints* em papel de filtro de 281 indivíduos com suspeita clínica ou com diagnóstico de LT atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) em Manaus, Amazonas. A identificação das espécies foi realizada por meio de sequenciamento do gene *hsp70*. Foram identificadas as espécies de *Leishmania* causadora de LT em 89% (250/281) das amostras analisadas, destas 9,6% (24/250) foram de espécies de baixa circulação procedentes de 7(sete) municípios identificados como locais de infecção (Manaus, Rio Preto da Eva, Presidente Figueiredo, Itapiranga, Novo Airão, Manaquiri e Manacapuru). Os pacientes apresentaram características clínicas semelhantes aos outros casos, causados pelas espécies mais frequentes. Dentre as espécies de interesse neste estudo *L. (V.) naiffi* foi identificada em 3,6% (9/250) pacientes, *L. (L.) amazonensis* 3,2% (8/250) e *L. (V.) lainsoni* 2,8% (7/250). *L. (V.) naiffi* foi a mais frequente e a *L. (V.) lainsoni* foi a que apresentou maior distribuição espacial na região estudada. Foram observadas evidências de cepas híbridas entre *L. guyanensis* e *L. shawi*. São necessários novos estudos para melhor compreensão da ecoepidemiologia e aspectos genéticos de *Leishmania* spp. no estado, tendo em vista que este foi o primeiro estudo a relatar a co-circulação de populações distintas dessas espécies.

Palavras-chaves: leishmaniose humana, caracterização de espécies de *Leishmania*, cepas de baixa circulação.

ABSTRACT

Tegumentary leishmaniasis (TL) is a highly endemic anthroponosis and an important public health problem in the Amazon region. In the state of Amazonas, the occurrence of six species of *Leishmania* that cause disease in humans has already been recorded. However, information on the frequency of low-circulation species and clinical aspects has not been much observed. The present study aimed to investigate the occurrence of low-circulation *Leishmania* species in cases of tegumentary leishmaniasis, indigenous to the Amazon. Tissue samples obtained by skin biopsy and imprints on filter paper from 281 individuals with clinical suspicion or diagnosis of TL treated at the Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) in Manaus, Amazonas. Species identification was performed by sequencing the hsp70 gene. The *Leishmania* species that cause LT were identified in 89% (250/281) of the analyzed samples, of which 9.6% (24/250) were low-circulation species from 7 (seven) municipalities identified as sites of infection (Manaus, Rio Preto da Eva, Presidente Figueiredo, Itapiranga, Novo Airão, Manaquiri and Manacapuru). The patients presented clinical characteristics similar to the other cases, caused by the most frequent species. Among the species of interest in this study, *L. (V.) naiffi* was identified in 3.6% (9/250) patients, *L. (L.) amazonensis* 3.2% (8/250) and *L. (V.) lainsoni* 2.8% (7/250). *L. (V.) naiffi* was the most frequent and *L. (V.) lainsoni* was the one with the highest spatial distribution in the region studied. Evidence of hybrid strains between *L. guyanensis* and *L. shawi* was observed. Further studies are needed to better understand the ecoepidemiology and genetic aspects of *Leishmania* spp. in the state, bearing in mind that this was the first study to report the co-circulation of distinct populations of these species.

Key words: human leishmaniasis, characterization of *Leishmania* species, low circulation strains.

RESUMO LEIGO

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença muito importante e comum na região Amazônica, está presente em vários lugares e tem várias formas clínicas. No estado Amazonas seis tipos de *Leishmania* já foram registradas causando essa doença em humanos. Ainda não compreendemos muito bem sobre como essa doença se comporta quando ela é causada por espécies que menos são encontradas na região. O objetivo desse trabalho foi investigar a frequência com que espécies menos comuns estão causando doença em pacientes que tiveram a doença no Amazonas. Foram analisadas amostras de pele humana de 281 pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus, Amazonas. Foram identificadas espécies de *Leishmania* em 250 amostras, destas 9,6% (24/250) foram de espécies de baixa circulação que vieram de sete municípios (Manaus, Rio Preto da Eva, Presidente Figueiredo, Itapiranga, Novo Airão, Manaquiri e Manacapuru). Os pacientes tiveram as características clínicas iguais aos pacientes infectados pelas espécies mais frequentes. Dentre as espécies que interessaram para esse estudo a *L. (V.) naiffi* foi a mais frequente e a *L. (V.) lainsoni* foi a que esteve mais distribuída entre os municípios. Foram identificadas espécies misturadas entre *L. guyanensis* e *L. shawi*. É necessário fazer novos estudos para compreender melhor as características genéticas de *Leishmania* no estado, tendo em vista que este foi o primeiro estudo a relatar a circulação de populações diferentes dessas espécies.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mutilações em nariz, lábios e garganta causadas por leishmaniose tegumentar, no período pré-inca. | 2 |
| Figura 2. Manifestações clínicas da LT. | 4 |
| Figura 3. Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp. | 7 |
| Figura 4. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. | 8 |
| Figura 5. Flebotomíneo adulto. | 9 |
| Figura 6. Status da leishmaniose tegumentar no mundo, 2020. | 15 |
| Figura 7. Número de casos de LCL e LM na Região das Américas e sub-regiões, 2001-2019. | 16 |
| Figura 8. Prevalência de LT em humanos para 10.000 habitantes nas diferentes regiões do Brasil, no período de 2011 a 2020. | 18 |
| Figura 9. Número de casos absolutos de LT por município do Amazonas - 2011 a 2020. | 19 |
| Figura 10. Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> nas Américas. | 21 |
| Figura 11. Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> causadoras de LT no Brasil. | 22 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1. Características das subformas da leishmaniose mucosa. | 6 |
| Quadro 2. Espécies de <i>Leishmania</i> causadoras de leishmaniose em humanos. | 20 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

| | |
|-----------------------|---|
| AM | Amazonas |
| BLASTn | <i>Basic Local Alignment Search Tool nucleotide</i> |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| cm² | Centímetro quadrado |
| cPCR | PCR convencional |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNTPs | Desoxirribonucleotídeos fosfatados |
| ELISA | Ensaio imunoenzimático |
| FIOCRUZ | Instituto Oswaldo Cruz |
| FMT-HVD | Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado |
| HSP70 | Heat shock protein 70 |
| IC | Teste imunocromatográfico |
| IDRM | Intradermoreação de Montenegro |
| IFAT | Imunofluorescência indireta de anticorpos |
| IFI | Imunofluorescência indireta |
| ILMD | Instituto Leônidas & Maria Deane |
| ITS | Internal Transcribed Space |
| Kg | Quilograma |
| L. | <i>Leishmania</i> |
| LC | Leishmaniose cutânea |
| LCD | Leishmaniose cutânea difusa |
| LCL | Leishmaniose cutânea localizada |
| LCM | Leishmaniose cutaneomucosa |
| LIT | Liver Infusion Triptose |
| LM | Leishmaniose mucosa |
| LT | Leishmaniose tegumentar |
| LTA | Leishmaniose tegumentar americana |
| LV | Leishmaniose visceral |

| | |
|-----------------|--|
| McAbs | Anticorpos monoclonais espécies-específicos |
| MgCl | Cloreto de Magnésio |
| mg | Miligrama |
| ml | Mililitros |
| mm | Milímetros |
| µl | Microlitros |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NNN | Neal, Novy, Nicolle |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| OPAS | Organização Pan-americana da Saúde |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| SisLeish | Sistema de informações de leishmanioses |
| TCLE | Termo de consentimento livre e esclarecido |
| V. | <i>Viannia</i> |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Aspectos gerais | 1 |
| 1.1.1 Histórico | 1 |
| 1.2 Leishmaniose tegumentar..... | 4 |
| 1.2.1 Manifestações clínicas | 4 |
| 1.2.2 Agente etiológico..... | 6 |
| 1.2.3 Formas evolutivas, ciclo de vida e transmissão | 7 |
| 1.2.4 Diagnóstico..... | 10 |
| 1.2.5 Métodos para identificação de espécies de <i>Leishmania</i> | 11 |
| 1.2.6 Tratamento | 13 |
| 1.2.7 Epidemiologia..... | 14 |
| 1.2.8 Diversidade de espécies de agentes etiológicos..... | 19 |
| 1.2.9 Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> nas Américas e Brasil | 20 |
| 1.2.10 LT no Amazonas | 25 |
| 1.3 Justificativa | 27 |
| 2. OBJETIVOS..... | 28 |
| 2.1 Geral | 28 |
| 2.2 Específicos | 28 |
| 3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO | 29 |
| 4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS..... | 48 |
| 5. CONCLUSÃO | 49 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 50 |

| | |
|--|-----------|
| 7. APÊNDICES | 61 |
| 7.1 Termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE | 61 |
| 7.2 Ficha clínica do participante | 63 |
| 7.3 Parecer cosubstanciado do comitê de ética em pesquisa – CEP | 64 |
| 7.4 Cronograma | 66 |
| 7.6 Equipe de trabalho | 67 |
| | |
| 8. ANEXOS | 68 |
| 8.1 Termo de anuência Fundação Alfredo da Matta – FUAM | 68 |
| 8.2 Procedimento operacinal padrão (POP) – Coleta de material escarificado em papel filtro | 69 |
| 8.3 Procedimento operacinal padrão (POP) – Extração de ácidos nucleicos. . | 72 |
| 8.4 Procedimento operacinal padrão (POP) – PCR convencional | 75 |
| 8.5 Procedimento operacinal padrão (POP) – Eletroforese | 78 |
| 8.6 Procedimento operacinal padrão (POP) – Purificação de produto da PCR | 81 |
| 8.7 Procedimento operacinal padrão (POP) – Sequenciamento de DNA | 83 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por diferentes espécies de protozoários digenéticos do gênero *Leishmania*, transmitidos pela fêmea de flebotomíneos. Formam um complexo grupo de doenças que apresentam diversidade clínica e epidemiológica (1).

São consideradas doenças negligenciadas, uma vez que ocorrem nos países mais pobres e atingem as populações mais vulneráveis, com difícil acesso aos serviços de saúde (2). As manifestações clínicas são caracterizadas em três formas principais: a leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose visceral (LV). Estes fenótipos clínicos são influenciados por fatores inerentes ao hospedeiro e a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (3).

1.1.1 Histórico

Essas enfermidades apresentam registros antigos, desde o primeiro século d.C., na Ásia Central. Inicialmente as lesões recebiam nomes diferentes de acordo com a região em que eram encontradas, tais como ferida de Balkh, botão de Alepo, botão de Briska, enquanto os viajantes o chamavam de Botão do Oriente (4).

No velho mundo, no início do século XX, o médico patologista escocês William Boog Leishman (1865 – 1926), oficial do exército britânico, detectou formas ovoides em amostras de fluido de baço de um soldado que morrera apresentando emagrecimento e esplenomegalia, na Índia (5). No mesmo ano, médico irlandês Major Charles Donovan (1863 – 1951), publicou um artigo

relatando formas semelhantes em amostras esplênicas em indianos com quadro de febre e esplenomegalia (6).

Em 1903, após o encontro dessas formas em feridas conhecidas como Botão do Oriente, em uma menina armênia, o médico britânico Ronald Ross (1857 – 1932), relaciona essas feridas com seu agente etiológico denominado *Welcozonia tropicum*, renomeado de *Leishmania tropica* por James Homer Wright (7).

No novo mundo, os primeiros relatos também ocorreram no primeiro século d.C., na região do Peru e Equador. Acredita-se que esses relatos tenham sido representados no período pré-inca por esculturas artesanais mochicas e huaco e algumas imagens, que representavam mutilações em regiões do nariz e lábios de indivíduos da região (**Figura 1**) (8).



Figura 1. Mutilações em nariz, lábios e garganta causadas por leishmaniose tegumentar, no período pré-inca.

Fonte: Vale D, 2005.

Em 1909, Adolpho Lindenberg (1872-1944) demonstra formas do parasito em lesões cutâneas de indivíduos acometidos de “Úlcera de Bauru” no estado São Paulo, Brasil. Era então descrita, pela primeira vez, casos dessas lesões causadas por parasitos de gênero *Leishmania* na América Latina, o que passou a ser chamada de leishmaniose tegumentar americana (LTA). Mais tarde em 1911, após investigações em pacientes com lesões mucosas o parasito foi identificado pelo cientista Gaspar Vianna (1885 – 1914), denominando-o de *Leishmania braziliensis* (9).

A identificação do agente permitiu a constatação da endemia em diversas localidades no Brasil, entre outros, o Vale do Rio Doce em Minas Gerais, sul da Bahia, região Amazônica (10). Acreditava-se que a *Leishmania braziliensis* era o único agente da leishmaniose tegumentar existente no país. Até o início dos anos 60, a classificação dos parasitas era feita exclusivamente através do comportamento clínico evolutivo, configurado em diversas formas clínicas da doença em diversas regiões geográficas, uma vez que a visualização do parasito por microscopia não permitia sua distinção (11).

A partir daí, com o avanço e aprimoramento em ferramentas como microscopia eletrônica, biologia molecular, bioquímica e imunologia foi possível estabelecer novas perspectivas na taxonomia de *Leishmania spp.* (12). Os métodos permitiam o estudo morfométrico das diferentes formas de *Leishmania* à microscopia eletrônica, eletroforese de isoenzimas, determinação da densidade flutuante do Ácido desoxirribonucleico (DNA) do núcleo e do cinetoplasto, análise de produtos de degradação do DNA por enzimas de restrição, hibridização do DNA/RNA e análise do DNA do cinetoplasto por reação em cadeia da polimerase (13–16).

Atualmente as classificações mais aceitas seguem o modelo taxonômico proposto em 1987 por Lainson & Shaw, na qual divide as leishmanias em dois subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (17).

Inúmeras espécies já foram descritas infectando humanos e animais, grande parte dessas cepas foram isoladas pela primeira vez de lesões em humanos ou de hospedeiros reservatórios selvagens nas regiões sudeste e nordeste do Pará, sendo suas caracterizações feitas por eletroforese de isoenzimas e o teste imunofluorescência indireta de anticorpos (IFAT), usando anticorpos monoclonais espécie-específicos (McAbs) (18).

1.2 Leishmaniose tegumentar

1.2.1 Manifestações clínicas

As espécies de *Leishmania* podem causar diferentes formas de leishmaniose em seres humanos, embora grande parte das infecções provavelmente permaneça assintomática (19).

As lesões podem ser únicas, múltiplas e localmente destrutivas (20). Desta forma, as apresentações clínicas recebem diferentes classificações, podendo ser subdivididas nas seguintes formas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea ou mucosa (LM) (21). As apresentações clínicas são demonstradas na **Figura 2**.

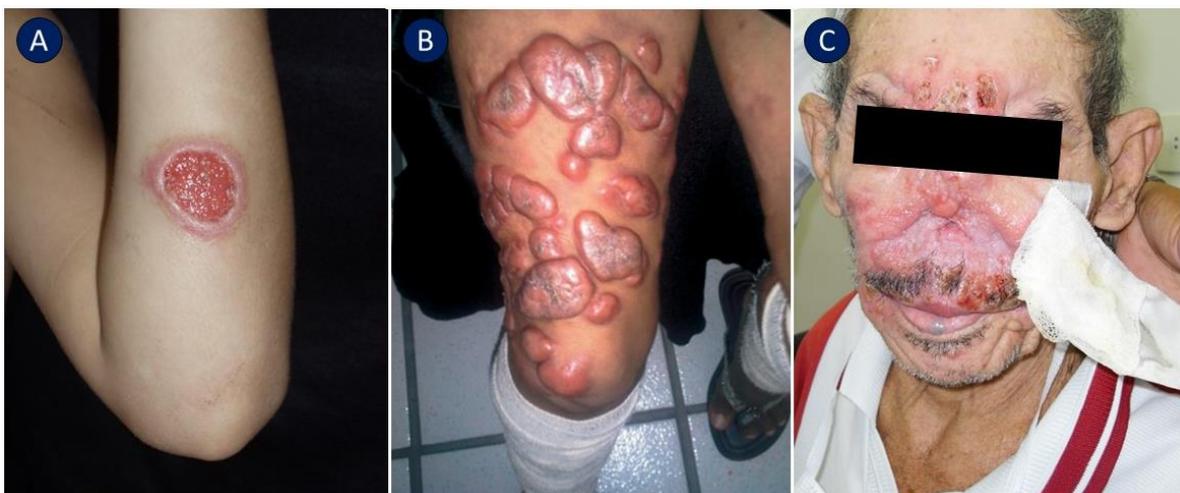


Figura 2. Manifestações clínicas da LT.

A. leishmaniose cutânea localizada; **B.** leishmaniose cutânea difusa; **C.** leishmaniose mucosa.

Fonte: A. e C. Guerra JAO; B. Mokni, 2019.

- **Leishmaniose cutânea localizada (LCL):** se apresenta como a manifestação clínica mais frequente e variam de tamanho, aparência clínica e tempo de cura. Um dos primeiros sinais é tipicamente um pequeno eritema que se desenvolve no local onde o flebotômíneo infectado picou no hospedeiro,

geralmente rosto, antebraços e pernas (21). O eritema se desenvolve e chega ao estágio de pápula, em seguida, forma-se um nódulo evolui ao longo do tempo (entre 2 semanas e 6 meses) até se tornar uma lesão do tipo úlcera (**Figura 2-A**), em algumas situações pode haver cura espontânea (22). As espécies de *Leishmania* responsáveis por esta subforma clínica são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (L.) amazonensis* (23).

- **Leishmaniose cutânea difusa (LCD):** é uma forma é rara, observada na Etiópia, Quênia, América do Sul e Central. Apresenta aspecto clínico, imunológico, parasitológico, anatomopatológico e terapêutico diferente de outras formas de LT (24). As lesões apresentam-se como eritemas, pápulas, tubérculos, nódulos, infiltrações difusas e aspecto tumoral que se disseminam a partir do local inicial da infecção e podem cobrir quase toda a superfície corporal do paciente (**Figura 2-B**). No Brasil é causada por *L. (L.) amazonensis*, rara, porém de gravidade significativa (19).

- **Leishmaniose mucocutânea ou mucosa (LM):** o envolvimento da mucosa é a complicação mais grave dentre as formas de LT. De maneira geral, surge em consequência de formas cutâneas que evoluem posteriormente ou consequentemente para lesões com potencial risco de vida e desfiguração dos pacientes (25). Caracteriza-se imunologicamente pela resposta celular exacerbada do hospedeiro e pela escassez de parasitos (26). O comprometimento mucoso ocorre após a metástase do parasita nas mucosas nasal, orofaríngea, palato mole e duro, lábios, língua, laringe e alguns casos para traqueia e brônquios superiores (25). A LM apresenta diferentes subformas clínicas (**Quadro 1**), no entanto está relacionada principalmente com a origem e o período de apresentação da lesão mucosa (**Figura 2-C**). Essa forma é causada predominantemente por *L. (V.) braziliensis*, entretanto, Guerra et al. (2011) mostraram a importância da *L. (V.) guyanensis* como agente etiológico dessa forma em um terço de uma série de 46 casos de LM oriundos da Amazonia (27).

A *Leishmania (V.) panamensis* e a *L (V.) amazonensis*, embora raramente, também tem sido associadas a comprometimento mucoso da LT (28).

Quadro 1. Características das subformas da leishmaniose mucosa.

| Sub-forma Clínica | Principais características |
|--------------------------------|---|
| Mucosa tardia | Surgimento de lesão mucosa até muitos anos após cicatrização de lesão cutânea (espontânea ou medicamentosa insuficiente). É a forma mucosa mais frequentes. |
| Mucosa de origem indeterminada | Surgimento de lesão mucosa sem apresentação prévia de lesão cutânea. Acredita-se que esteja associada a infecções subclínicas ou lesões pequenas imperceptível. |
| Mucosa concomitante | Surgimento de lesão cutânea e mucosa concomitantes, porém em regiões distintas do corpo. |
| Mucosa contígua | Surgimento de lesão cutânea devido a disseminação de uma lesão cutânea próximo a mucosa das vias aéreas aerodigestivas. |
| Mucosa primária | Surgimento de lesão mucosa por picada direta do inseto na mucosa ou semimucosas. |

Fonte: Brasil, 2017 (29).

1.2.2 Agente etiológico

O gênero *Leishmania*, é classificado taxonomicamente da seguinte forma (31):

Reino: Protistas (Haeckel, 1866);

Sub-reino: Protozoa (Goldfus, 1817);

Filo: Sarcomastigophora (Honigberg e Balamuth, 1963);

Subfilo: Mastigophora (Desing, 1966);

Classe: Zoomastigophorea (Calkins, 1909);

Ordem: Kinetoplastida (Honigberg, 1963; Emed. Vickerman, 1976);

Subordem: Trypanosomatina (Kent, 1880);

Família: Trypanosomatidae (Döflein, 1901);

Gênero: *Leishmania* (Ross, 1903);

Subgênero: *Viannia* (Saf' Jonova, 1982) e *Leishmania* (Lainson e Shaw, 1987).

1.2.3 Formas evolutivas, ciclo de vida e transmissão

As principais formas evolutivas de *Leishmania* são promastigota encontrada no hospedeiro invertebrado (flebotomíneo) e a amastigota presente no hospedeiro vertebrado (mamíferos) (32). A amastigota possui formato esférico sem flagelo livre, com cinetoplasto evidente, seu tamanho varia de 2 a 4 μm (micrômetros) de diâmetro. As promastigotas são células alongadas com flagelo emergente e cinetoplasto anterior, geralmente se apresentam em forma de lança e variam em tamanho, com 5 a 14 μm de comprimento por 1,5 – 3,5 μm de largura (33). Ambas as formas estão representadas na **Figura 3**.

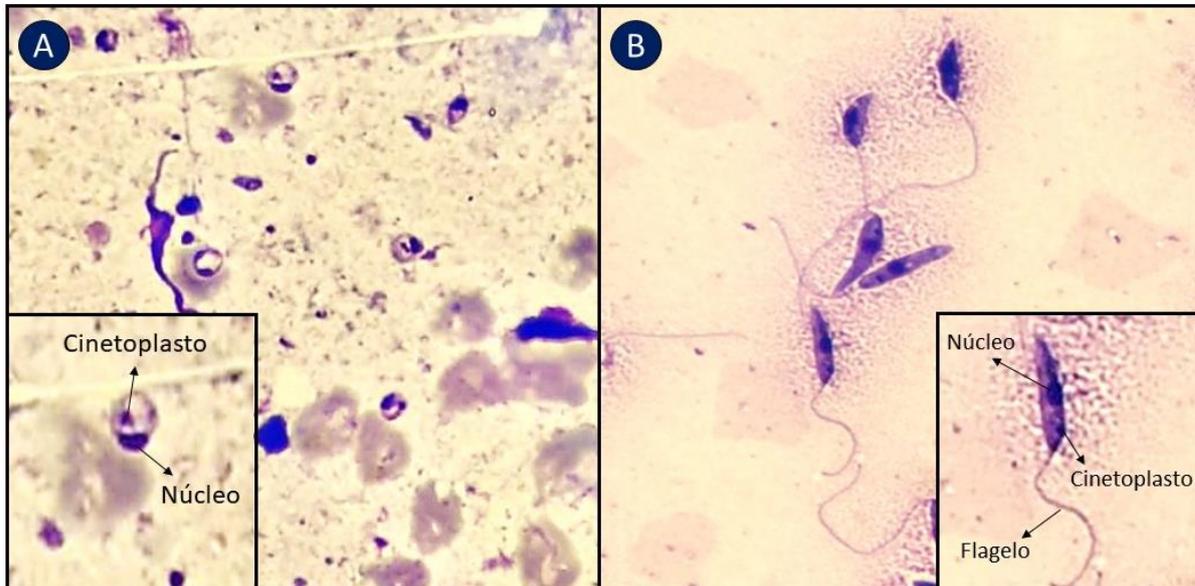


Figura 3. Formas evolutivas de *Leishmania* spp.

A. Amastigotas; **B.** Promastigotas. Fonte: Acervo pessoal.

Seu ciclo de vida (**Figura 4**) envolve hospedeiros invertebrados (insetos flebotomíneos) e vertebrados (mamíferos) (22). O homem ao exercer atividades

em ambientes silvestre, se insere no ciclo do parasita, caracterizando a transmissão da doença em caráter antroponótico (19).

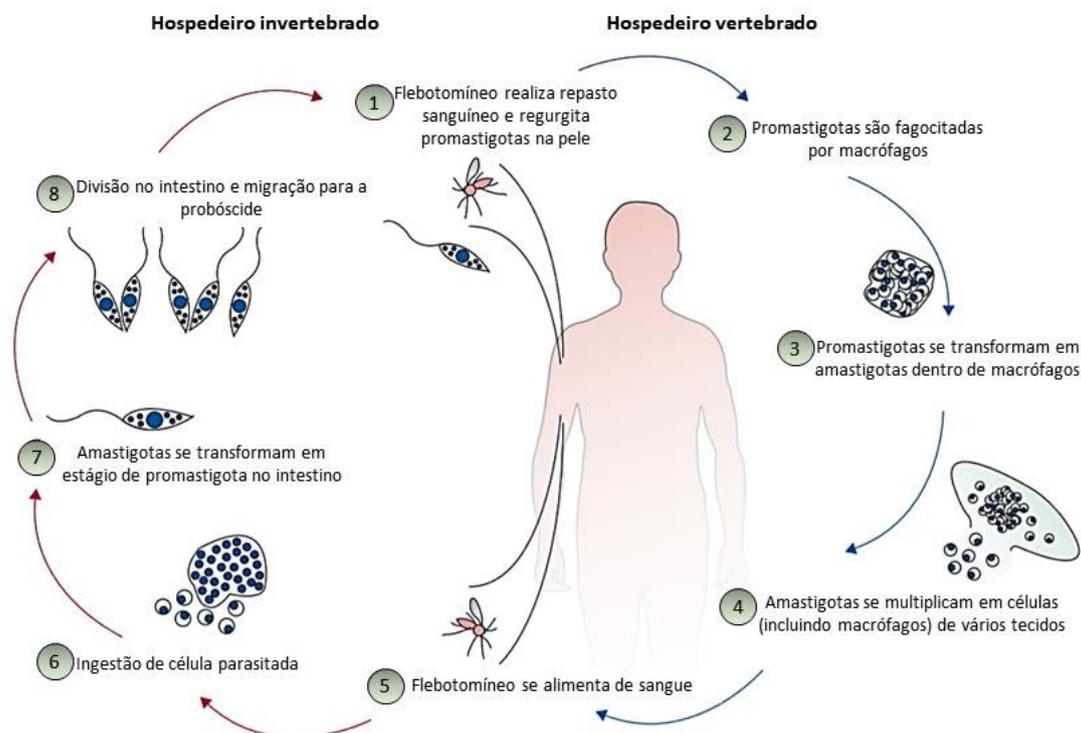


Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Nota: No repasto sanguíneo a fêmea do flebotomíneo regurgita na pele do hospedeiro vertebrado formas promastigotas do parasita [1], estas invadem ou são fagocitadas por células do sistema imune do hospedeiro, principalmente macrófagos [2]. No interior dessas células, em compartimentos denominados fagolisossomos as promastigotas resistentes se diferenciam em amastigotas [3]. As amastigotas se replicam por fissão binária e podem então infectar outros fagócitos locais ou de tecidos distantes [4]. As fêmeas dos flebotomíneos ao se alimentar de sangue de um hospedeiro infectado [5], ingerem macrófagos contendo formas amastigotas do parasita [6], que no intestino médio do inseto se diferenciam em formas promastigotas [7]. Os parasitos migram para a probóscide do flebotomíneo completando o ciclo de vida da *Leishmania* [8]. Fonte: Reithinger R, 2007 (19).

As espécies de *Leishmania* apresentam especificidade variada e estão associadas a diversas espécies de insetos flebotomíneos da ordem Díptera, Família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, Gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente como mosquito-palha, tatuquira, birigui, entre outros (34,35). São insetos pequenos (**Figura 5**), de corpo piloso e asas lanceoladas (36). Somente as fêmeas são hematófagas, e sua importância médica se dá por conta de sua

capacidade de veicular patógenos causadores de infecções em humanos e outros animais (42).



Figura 5. Flebotomíneo adulto.

Fonte: Springer N, 2008.

No Brasil são encontradas mais 280 espécies de flebotomíneos, 13 delas comprovadamente vetores de leishmaniose, sendo o *Lutzomyia umbratilis* o principal vetor da leishmaniose cutânea causada por *L (V.) guyanensis* (37,38). O Brasil abriga grande variedade de espécies, distribuídas nos gêneros *Nyssomyia*, *Psychodopygus* e *Trichophoromyia* (39).

Diferentes espécies de *Leishmania* são transmitidas por diferentes espécies de flebotomíneos, podendo haver uma certa relação com os reservatórios mamíferos, dessa forma caracterizando diferentes ciclos de transmissão (40). A interação parasito-reservatório se apresenta como um sistema complexo, uma vez que é multifatorial, imprevisível e dinâmica, formando uma unidade biológica que pode estar em constante mudança em função das alterações do meio ambiente. Considera-se reservatórios, as espécies de animais que garantem a circulação de do parasito na natureza, estes incluem várias espécies de mamíferos principalmente silvestre (41).

No novo mundo a maioria das transmissões de *Leishmania* estão frequentemente associados a habitats silvestres, embora algumas espécies

exibam transmissão predominantemente peridoméstica. A preferência do hospedeiro também é um fator importante que afeta a modalidade de transmissão do parasita por um vetor que pode ocorrer entre animais selvagens, de animais para o homem ou entre pessoas (30).

1.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da LT depende das manifestações clínicas, dados epidemiológicos e laboratoriais (42). Inúmeros métodos foram desenvolvidos com variações na sensibilidade e especificidade, alguns com objetivo apenas de detectar a presença do agente etiológico, (utilizados na rotina de serviços da saúde) e outros com capacidade de detecção e identificação da espécie de *Leishmania* responsável pela infecção, fundamental para fornecimento de informações que orientem o tratamento mais adequado e o prognóstico clínico do paciente, ainda usado apenas em pesquisa (43,44).

Os métodos mais utilizados para o diagnóstico de rotina são os métodos parasitológicos, que tem por finalidade a detecção do parasito diretamente da amostra clínica. Entre eles, o exame direto do escarificado de lesão é o procedimento mais utilizado por ser de fácil execução e baixo custo, sendo, portanto, o método de primeira escolha para o diagnóstico da LT (43). Embora não seja frequentemente utilizada em rotina, métodos indiretos complementares, como a cultura de parasitas em meio sólido NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) ou líquidos como Schneider e LIT (Liver Infusion Triptose) aumentam a sensibilidade de detecção e possibilita a posterior identificação (por outros métodos) da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (45).

Métodos imunológicos são importantes ferramentas em casos inconclusivos ou em pacientes com suspeita de doença antiga. O método de ELISA indireto é um dos mais utilizados, busca detectar anticorpos anti-*Leishmania* presente na amostra de sangue do paciente (42). Do mesmo modo, na IFI (Imunofluorescência indireta) são utilizados substratos contendo antígeno

de *Leishmania* que são fixados em uma lâmina (fase sólida), em casos de presença de anticorpos anti-*Leishmania* na amostra analisada, é gerada fluorescência visível ao se utilizar microscópio de fluorescência (46).

Com o avanço e aperfeiçoamento dos métodos sorológicos de ELISA e IFI, alguns métodos imunológicos como a Intradermoreação de Montenegro (IDRM) tem sido cada vez menos utilizados. Esse método traduz a resposta de hipersensibilidade celular tardia após uma injeção de solução contendo antígenos de *Leishmania* na região do antebraço. O resultado é considerado positivo quando, após 72 horas, se observa uma pápula ou nódulo maior ou igual a 5 mm de diâmetro. Em áreas endêmicas deve-se investigar a possibilidade de leishmaniose anterior ou infecções assintomáticas (29).

1.2.5 Métodos para identificação de espécies de *Leishmania*

Alguns métodos imunológicos possuem a capacidade de identificação das espécies do parasito, como é o caso a técnicas que utilizam anticorpos monoclonais. Nesta técnica, ocorre a interação antígeno-anticorpo utilizando um painel de anticorpos monoclonais espécie, gênero e/ou subgênero específico capaz de diferenciar espécies de *Leishmania*, gerando um conjugado capaz de diferenciar espécies de acordo. Uma das principais limitações é a necessidade de isolamento prévio do parasita em cultura, aumentando seu tempo de execução e custos (47).

Embora ainda não utilizados na rotina de diagnóstico de LT, a utilização de métodos moleculares tem se tornado cada vez mais relevantes devido a sua alta sensibilidade, especificidade e a possibilidade de aplicação em uma variedade de amostras clínicas (48). São baseados na detecção de sequências específicas de DNA do parasito, onde a PCR convencional (cPCR) e a PCR quantitativo em tempo real (qPCR) são as técnicas mais utilizadas (46,49).

As variações de métodos moleculares permitem a identificação da espécie do agente causador da doença, é o caso da PCR *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), baseado na análise de polimorfismos de um determinado fragmento de DNA expressos por diferentes espécies de *Leishmania*. Os fragmentos amplificados por PCR são submetidos à digestão enzimática e analisados por meio de eletroforese (50). Estudos recentes mostram a dificuldade da identificação adequada de espécies de *Leishmania* usando determinados alvos pelo método de RFLP, destacando a limitação desta abordagem para discriminação entre *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) lindenbergi* (51).

Por se tratar de uma técnica altamente sensível, específica e rápida a qPCR tem se tornado cada vez mais utilizada para identificação a nível de gênero, subgênero e espécies de *Leishmania*. Uma das grandes vantagens é possibilidade de realizar ensaios multiplex (detecção de vários alvos em uma única reação), isso de certa forma reduz parcialmente o custo do método e fornece especificidade adicional ao ensaio (48). Vários estudos tem sido desenvolvidos com o intuito de otimizar técnicas que possibilitam a caracterização de leishmanias, como sistemas que diferenciam os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (52). Outros ensaios foram desenvolvidos para detecção de diferentes alvos, não apenas para detecção e quantificação de *Leishmania*, mas também para genotipagem e diferenciação das espécies (53).

Outra técnica molecular que tem se tornado cada vez mais comum para identificação de espécies é o sequenciamento genômico, principalmente quando é inviável a aplicabilidade dos métodos tradicionais de identificação. Tem sido indicado como uma técnica de referência para caracterização de espécies de *Leishmania*, pois permite analisar uma série de genes onde as mutações apresentadas são usadas para tipagem (54).

Mesmo com os avanços dos métodos moleculares a *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE) ainda é considerado um padrão de referência para identificação de espécies. Trata-se de uma técnica de caracterização bioquímica

que permite identificar microrganismos por meio de mobilidade eletroforética de várias enzimas intracelulares (55). Revela a atividade metabólica de enzimas da célula após a migração, ou padrão de mobilidade específico da cepa, usando um conjunto definido de isoenzimas (56).

Assim como as técnicas que utilizam anticorpos monoclonais, na MLEE é necessário isolamento prévio do parasito, aumentando seu tempo de execução. Além disso a necessidade de equipamento especializado, falta de capacidade de discriminação entre algumas espécies e populações limitam sua aplicabilidade (57). Outra importante limitação é a exigência da análise de 15 perfis enzimáticos diferentes, fazendo com que essa técnica não esteja disponível em um laboratório não equipados (50).

1.2.6 Tratamento

Para todas as formas clínicas da LT, o tratamento é complicado, por ser realizado principalmente com drogas injetáveis. Os antimoniais pentavalentes são as drogas utilizadas como primeira linha, duas formulações estão disponíveis no mercado internacional: o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®), sendo este último não comercializado no Brasil (34). O tratamento pode ser local ou sistêmico, nesse segundo caso as injeções podem ser feitas por via intramuscular ou endovenosa, com repouso após as aplicações (35,58).

Medicamentos de segunda linha, como Pentamidina (principalmente no tratamento de *L. guyanensis*) e Anfotericina B, também são utilizados para tratar LT (61). Entretanto alguns fatores têm contribuído o menor uso desses medicamentos, no caso da Pentamidina a resistência e a toxicidade emergentes tem impedido seu uso, enquanto a anfotericina B possui capacidade de induzir toxicidade aguda e requer hospitalização (62).

Outros medicamentos alternativos como Miltefosina, cetoconazol, fluconazol e Itraconazol, além terapias dérmicas e crioterapia também tem sido utilizados no o tratamento da LT (59).

1.2.7 Epidemiologia

De acordo com a organização mundial da saúde (OMS) a LT é considerada uma das seis doenças infecciosas mais importantes devido ao seu alto coeficiente de detecção, capacidade de produzir deformidades, problemas econômicos e psicossociais (3).

Estas infecções dermatológicas continuam sendo um grande problema de saúde pública em 4 regiões ecoepidemiológicas do mundo: Américas, África Oriental e do Norte, Ásia Ocidental e Sudeste Asiático (**Figura 6**). Estima-se que 700.000 a 1,2 milhões de casos ocorram a cada ano, cerca de 95% dos casos notificados são oriundos das Américas, bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia central (60).

A LT é considerada endêmica em 98 países, destes 14 foram considerados altamente endêmicos desde 2014 (60). Sete países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Iraque, Paquistão e República Árabe Síria registram mais de 10.000 casos anuais de LT, representando mais 70% dos casos em todo mundo (60).

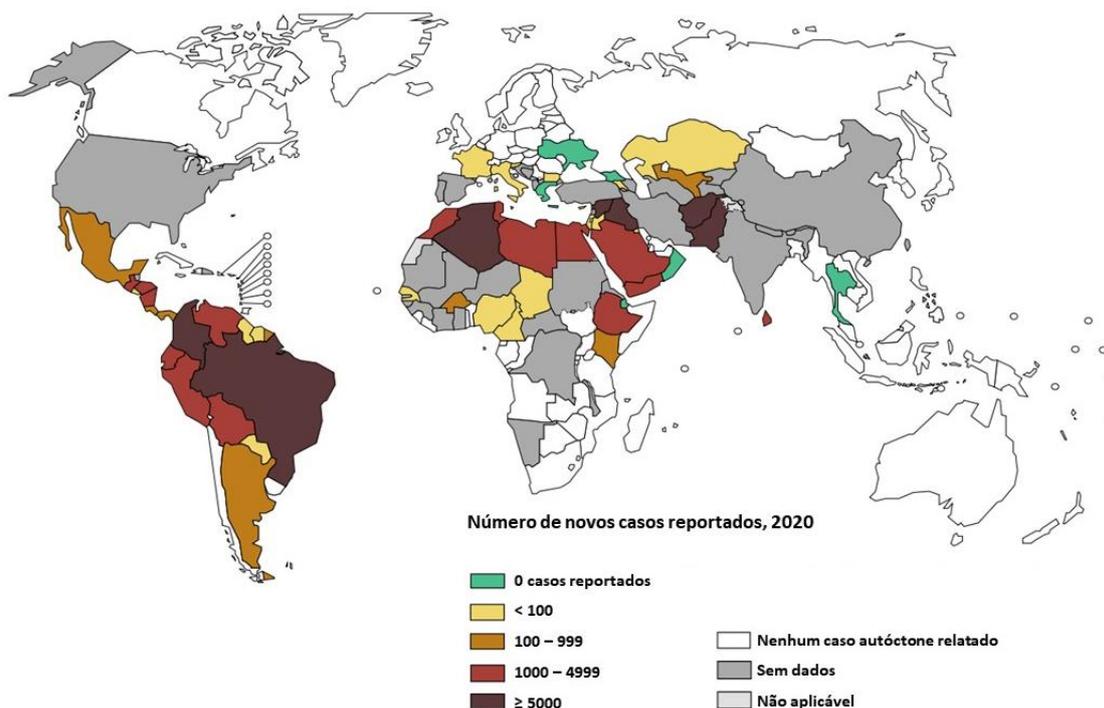


Figura 6. Status da leishmaniose tegumentar no mundo, 2020.

Fonte: Organization WH, 2020 (61).

Apesar de ser uma doença de notificação compulsória, na maioria dos países endêmicos, pressupõe-se que possa haver subestimação do real cenário epidemiológico da leishmaniose, devido à falha de diagnóstico e subnotificação dos casos (22). Além disso, a infecção assintomática não é detectada facilmente, ficando fora dos registros de notificação (19).

Nas américas, a LT possui alta relevância, por sua magnitude de ampla distribuição geográfica e por produzir formas clínicas com potencial risco de desenvolver mutilações, debilidades ou até mesmo a morte, tornando essas doenças um sério problema de saúde pública em 18 países do continente (23,62).

No período de 2001-2019 a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) registrou 1.028.054 casos de LCL e LM oriundos de 17 países endêmicos da América Central e Sul, com média anual de 54.108 casos, dos quais 40% ocorreram no Brasil (63).

Em 2005, a OPAS registrou o maior pico de casos no período de 20 anos (2001 - 2019) com aproximadamente 67.949 casos, entretanto, nos últimos anos, houve um decréscimo nos registros, chegando em 2019 com cerca de 41.617 casos (**Figura 7**). Essa tendencia decrescente na redução do número de casos ocorreu em 12 países: Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru e Venezuela (64).

Por meio das notificações obrigatórias é possível que os dados sejam reunidos e consolidados para análises e monitoramento por meio do sistema de informações de Leishmanioses – SisLeish/OPAS. Isso possibilita a atualização dos dados, facilitando assim a construção de planos que objetivam o fortalecimento da vigilância e o controle das doenças infecciosas nas Américas (64).

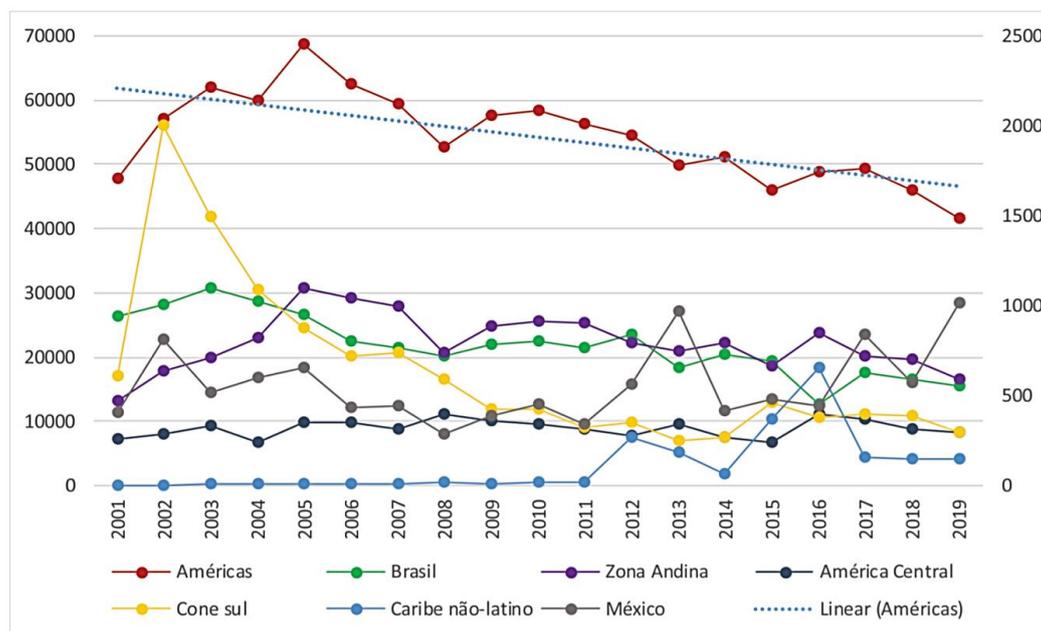


Figura 7. Número de casos de LCL e LM na Região das Américas e sub-regiões, 2001-2019.

Fonte: SisLeish-OPAS, 2021 (64).

Atualmente, os registros de LCL e LM continuam apresentando declínio em número de casos na região, no entanto, alguns países apresentam estabilidade e outros ascensão, isso reforça a necessidade de estudar os

determinantes ambientais e socioeconômicos visando melhor compreensão das diferenças que estão acontecendo entre os países (64).

No Brasil a LT apresenta um duplo perfil epidemiológico decorrente da manutenção de casos oriundos de focos antigos ou áreas próximas a eles. Além disso o surgimento de pequenos focos associados à expansão de áreas agrícolas, estabelecimento de áreas de extração de minérios, prospecção do petróleo, construção de rodovias e ocupação de periferias das cidades contribuem para manutenção da doença no país (65).

A média anual entre os anos de 2011 a 2020 foi de 19.327 casos, com notificação em todos os estados. A região Norte destaca-se como a região que mais notifica casos da doença, cerca de 85.096 casos no período citado, onde os estados do Pará e Amazonas respondem por 58% do total. Nesse período a região Norte apresentou o maior coeficiente de incidência (46,17 casos / 100 mil habitantes), seguido pelo Centro-Oeste (17,11 casos / 100.000 habitantes), Nordeste (10,88 casos / 100.000 habitantes), Sudeste (2,13 casos / 100.000 habitantes) e Sul (1,12 casos / 100.000 habitantes) **(Figura 8)** (66).

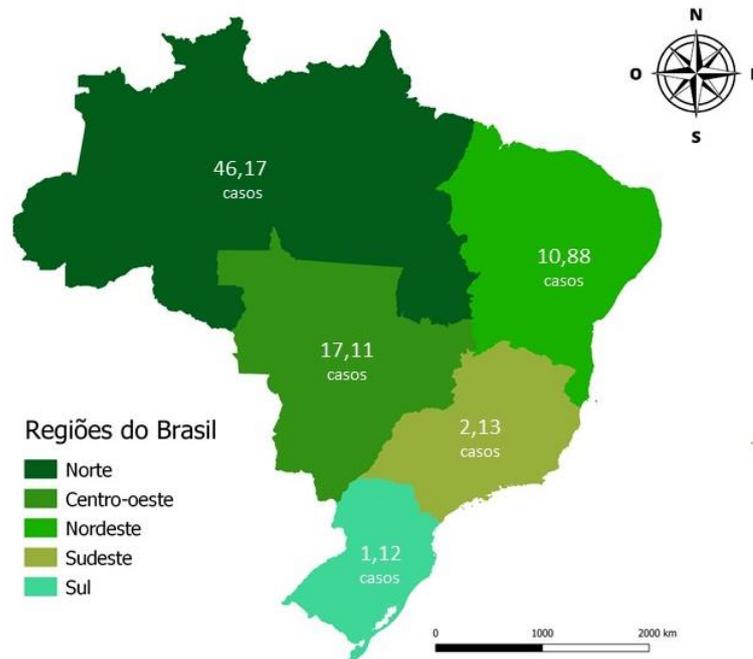


Figura 8. Prevalência de LT em humanos para 10.000 habitantes nas diferentes regiões do Brasil, no período de 2011 a 2020.

Fonte: adaptado do Sinan, 2021 (66).

Na região Norte, o estado Amazonas ocupa a segunda colocação em número de casos, ficando atrás apenas do estado do Pará. No período de 2011 a 2020 sete municípios notificaram mais de 400 casos da doença, sendo 60% destes, notificados por Manaus (7.213 casos), Presidente Figueiredo (1.717 casos) e Rio Preto da Eva (1.524 casos) (**Figura 9**) (66).

Os casos de LT são frequentemente relacionados ao tipo de ocupação exercida pela maioria dos indivíduos acometidos, como exposição no trabalho, atividades de extração vegetal, lazer e desmatamento desordenado, pois a instalação de pessoas em áreas recentemente desflorestadas aumenta a exposição aos insetos vetores, levando ao aumento de casos (67).

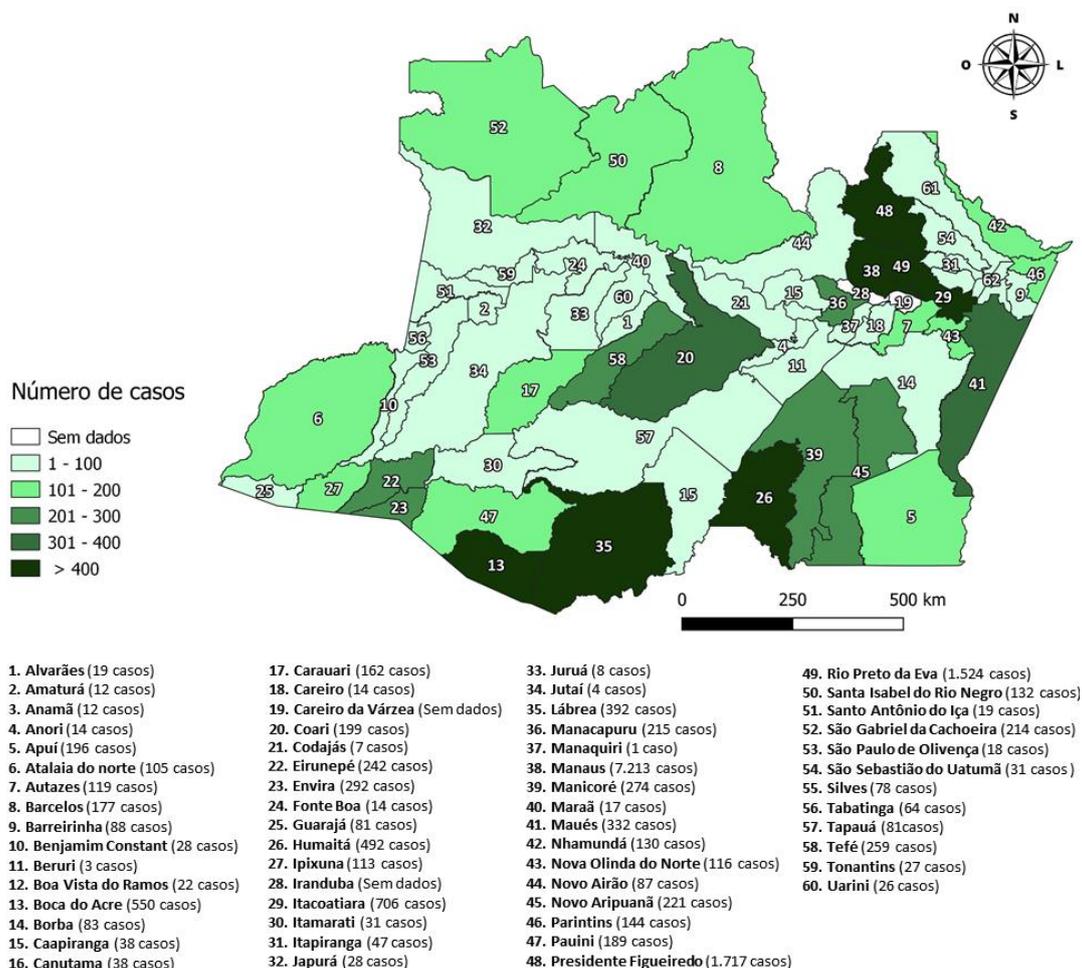


Figura 9. Número de casos absolutos de LT por município do Amazonas - 2011 a 2020.

Fonte: Adaptado do Sinan, 2021 (66).

O município de Manaus é o que mais notifica os casos da doença, sendo a maioria proveniente das rodovias AM 010 e BR 174, que ligam Manaus a Itacoatiara e Boa Vista, respectivamente (66,68). Nesses locais há uma presença significativa de trabalhadores de assentamentos agrícolas, além de treinamento realizado por organizações militares e balneários, o que contribui para o número significativo de casos de LT (67).

1.2.8 Diversidade de espécies de agentes etiológicos

O gênero *Leishmania* possui dois subgêneros que apresentam complexos diferentes e cada complexo inclui várias espécies. Atualmente em todo o mundo

53 espécies de *Leishmania* são descritas, destas 31 foram relatadas infectando mamíferos e cerca de 21 causam diferentes formas clínicas das leishmanioses em humanos (**Quadro 2**) (30).

As espécies apresentam uma ampla distribuição mundial, estando presentes em áreas tropicais e subtropicais, envolvendo as Américas, bacia do mediterrâneo, sudeste da Europa, Oriente Médio, Central e Sudeste da Ásia, subcontinente indiano e África (69).

1.2.9 Distribuição das espécies de *Leishmania* nas Américas e Brasil

Nas Américas, são conhecidas 14 espécies de *Leishmania* causadoras de doença em humanos, distribuídas desde os Estados Unidos ao Sul da Argentina. As espécies que apresentam maior distribuição são a *L. (V.) braziliensis* e a *L. (V.) panamensis*, conforme demonstra a **Figura 10** (64).

Quadro 2. Espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose em humanos.

| Subgênero | Espécie | Ocorrência | Distribuição |
|-------------------|-------------------------|------------------|--|
| <i>Leishmania</i> | <i>L. aethiopica</i> | Velho Mundo | África Oriental (Etiópia, Quênia) |
| | <i>L. amazonensis</i> | Novo Mundo | América do Sul (Brasil, Venezuela, Bolívia) |
| | <i>L. donovani</i> | Velho Mundo | África Central, Sul da Ásia, Oriente Médio, Índia, China |
| | <i>L. infantum</i> | Velho/Novo mundo | Países mediterrâneos (Norte da África e Europa), sudeste da Europa, Oriente Médio, Ásia Central, América do Norte, Central e do Sul (México, Venezuela, Brasil, Bolívia) |
| | <i>L. chagasi</i> | Velho/Novo mundo | Países mediterrâneos (Norte da África e Europa), sudeste da Europa, Oriente Médio, Ásia Central, América do Norte, Central e do Sul (México, Venezuela, Brasil, Bolívia) |
| | <i>L. major</i> | Velho Mundo | África do Norte e Central, Oriente Médio, Ásia Central |
| | <i>L. mexicana</i> | Novo Mundo | EUA, Equador, Venezuela, Peru |
| | <i>L. tropica</i> | Velho mundo | África do Norte e Central, Oriente Médio, Ásia Central, Índia |
| | <i>L. venezuelensis</i> | Novo Mundo | Norte da América do Sul, Venezuela |
| | <i>L. waltoni</i> | Novo Mundo | República Dominicana |

| | | | |
|---------|------------------------|-------------|---|
| | <i>L. arabica</i> | Velho mundo | Arábia Saudita |
| | <i>L. turanica</i> | Velho mundo | China, Ásia Central e Ocidental |
| Viannia | <i>L. braziliensis</i> | Novo Mundo | Bacia da Amazônia Ocidental, América do Sul (Guatemala, Venezuela, Brasil, Bolívia, Peru) |
| | <i>L. guyanensis</i> | Novo Mundo | Norte da América do Sul (Guiana Francesa, Suriname, Brasil, Bolívia) |
| | <i>L. lainsoni</i> | Novo Mundo | Brasil, Bolívia, Peru |
| | <i>L. lindenbergi</i> | Novo Mundo | Brasil |
| | <i>L. naiffi</i> | Novo Mundo | Brasil, Guiana Francesa |
| | <i>L. panamensis</i> | Novo Mundo | América Central e do Sul (Panamá, Colômbia, Venezuela, Brasil) |
| | <i>L. peruviana</i> | Novo Mundo | Peru, Bolívia |
| | <i>L. colombiensis</i> | Novo mundo | Colômbia, Venezuela, Panamá |
| | <i>L. shawi</i> | Novo Mundo | Brasil |
| | | | |

Fonte: adaptado de Steverding, 2017 (69).

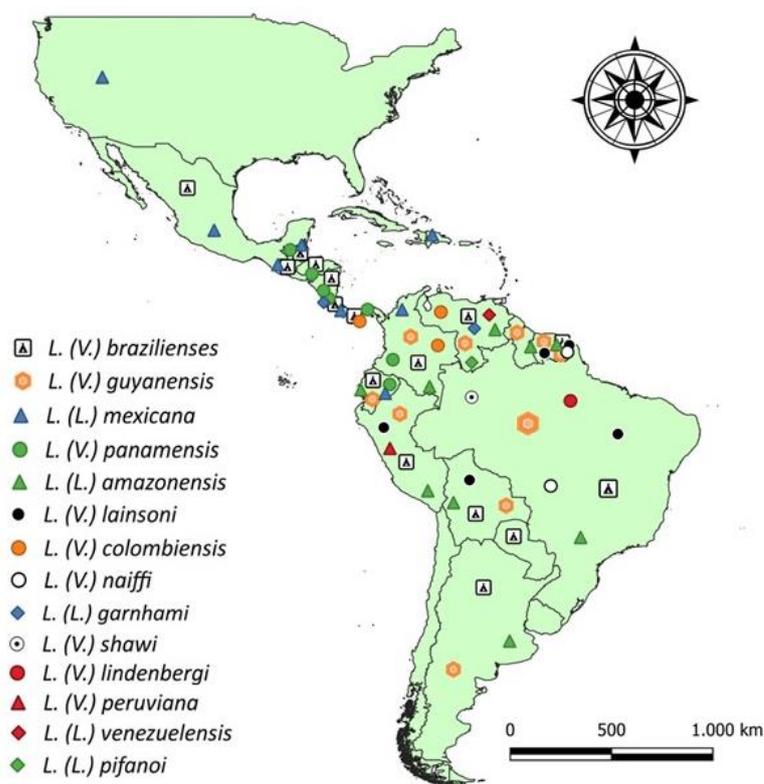


Figura 10. Distribuição das espécies de *Leishmania* nas Américas.

Fonte: Steverding D, 2017; SisLeish-OPAS, 2021.

No Brasil, já foi registrada a ocorrência de sete espécies de *Leishmania* causadoras de doença em humanos, são elas: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenbergi*, sendo a *L. (V.) braziliensis* a espécie que apresenta maior distribuição no território nacional, sendo descrita em todos os estados do Brasil (**Figura 11**). A *L. (V.) guyanensis* se apresenta como um dos principais agentes etiológico da doença no Brasil, já que é responsável pelo maior número de casos na Região Amazônica, onde estão os estados que apresentam a maior taxa de prevalência do país (35).

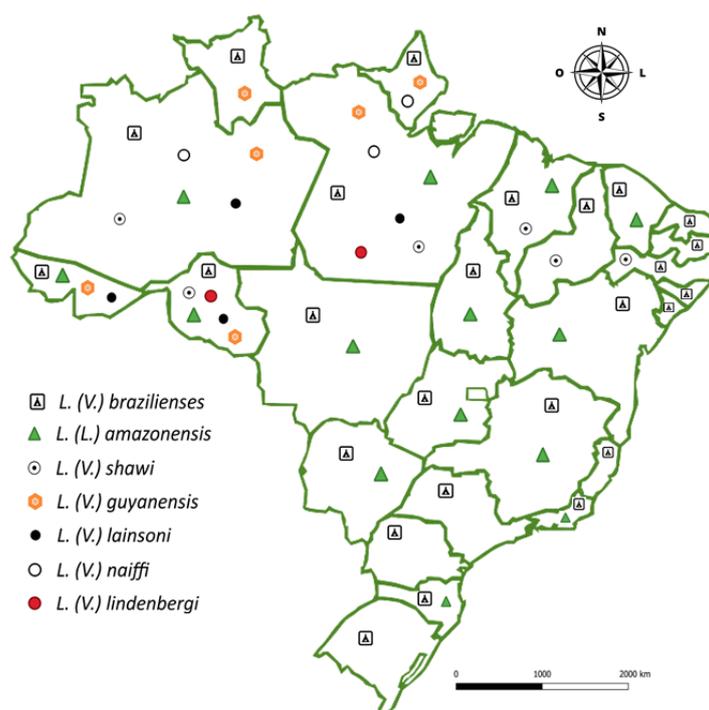


Figura 11. Distribuição das espécies de *Leishmania* causadoras de LT no Brasil.

Fonte: adaptado de SVS/MS, 2020.

A seguir serão descritas as principais características das espécies de *Leishmania* descritas no Brasil:

- ***Leishmania (Viannia) braziliensis***

A *L. (V.) braziliensis* foi a primeira espécie associada a etiologia da LT, sendo epidemiologicamente a mais importante em toda América Latina, com ampla distribuição desde a América Central até o Norte da Argentina (70).

No Brasil é encontrada em todas as zonas endêmicas do país, sendo transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos tais como, *Lutzomyia wellcomei*, *Lu. complexa*, *Lu. intermedia*, *Lu. whitmani*, *Lu. neivai* e *Lu. migonei* (34). Além disso, a espécie possui uma vasta diversidade de hospedeiros-reservatórios, incluindo roedores silvestres (*Bolomys lasiurus*, *Nectomys squamipes*) e sinantrópicos (*Rattus rattus*), felídeos (*Felis catus*), canídeos (*Canis familiaris*) e equídeos (*Equus caballus*, *Equus asinus*) (35).

- ***Leishmania (Viannia) guyanensis***

L. (V.) guyanensis, é a espécie, até então, restrita a Bacia Amazônica, abrangendo os estados do Acre, Amapá, Rondônia, Roraima, Amazonas e Pará, estendendo-se para as Guianas (71). É encontrada em áreas de florestas que não alagam em períodos chuvosos e possui ciclo epidemiológico relacionado com a copa das árvores, onde estão os flebotomíneos transmissores da espécie (35).

Tem como hospedeiros conhecidos a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), roedores (*Prochimys*), o marsupial (*Didelphis albiventris*) e o roedores (*Prochimys*), sendo transmitida pelos vetores *Lu. umbratilis* (primariamente), *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani* (secundariamente) (40,72).

- ***Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Apresenta-se distribuída em todas as regiões do Brasil, sobretudo em áreas de florestas primárias e secundárias da Amazônia Legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão) (73).

Os principais hospedeiros silvestres são roedores do gênero *Proechymis* e *Oryzomys* (34). Os flebotomíneos responsáveis pela transmissão são o *Lu. flaviscutellata*, *Lu. reducta* e *Lu. olmeca nociva*, espécies que possuem hábitos noturnos, voo baixo e pouca antropofilia, por isso a doença causada por esta espécie é considerada rara, porém quando estabelecida apresenta gravidade significativa. (35).

- ***Leishmania (Viannia) naiffi***

Encontrado nos estados do Amazonas, Rondônia, Pará e Amapá, esta espécie foi isolada e caracterizada em tatu (*Dasypus novemcinctus*), desta forma acredita-se que a espécie apresentará uma distribuição geográfica mais ampla se acompanhar a deste hospedeiro. A espécie é transmitida por *Lu squamiventris*, *Lu. paraensis* e *Lu. Ayrozai* (40,65,74).

- ***Leishmania (Viannia) shawi***

L. (V.) shawi está distribuída nos estados do Amazonas, Rondônia, Pará, Maranhão, Piauí e Pernambuco. Tem como hospedeiro alguns mamíferos silvestres, tais como: macacos (*Chiropotes satanas* e *Cebus apella*), quati (*Nasua nasua*) e preguiça (*Choloepus didactylus*), apesar do hábito arbóreo desses animais, a transmissão também ocorre em nível de solo. Tem como único vetor o *Lu. whitmani*, que habita tronco de árvores de florestas primárias (35,72)

- ***Leishmania (Viannia) lainsoni***

Distribui-se pela região Amazônica, sendo descrita nos estados do Pará, Rondônia, Acre e Amazonas. Tem como principal hospedeiro o roedor silvestre *Agouti paca* (paca). Seu vetor é o *Lutzomyia ubiquitalis*, um flebotomíneo de

baixa antropofilia, explicando assim o reduzido número de casos de doenças causadas por esta espécie (35,74)

- ***Leishmania (Viannia) lindenbergi***

É a espécie mais rara registrada no Brasil, tendo sido relatada apenas em duas ocasiões no país. O primeiro registro ocorreu em 2002, onde uma mulher e nove soldados da Infantaria Florestal Brasileira foram infectados em área de mata em Belém, Pará (75). Recentemente, em 2018, casos de LT associados a esta espécie foram relatados em dois municípios em Rondônia. Nas duas ocasiões os indivíduos acometidos apresentaram leishmaniose cutânea localizada (76).

Não se tem relatos de infecção em animais ou flebotomíneos, portanto seus hospedeiros-reservatórios e vetores ainda são desconhecidos. Entretanto, acredita-se que seu provável vetor seja o *Lu. antunesi* (75,76).

1.2.10 LT no Amazonas

No estado do Amazonas, seis espécies de *Leishmania* são responsáveis por causar LT em humanos, envolvendo as apresentações clínicas nas formas cutânea e mucosa: *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lainsoni* (77–79). A única espécie ainda não descrita no estado é a *L. (V.) lindenbergi*, no entanto acredita-se que esta espécie também possa estar em circulação, uma vez que já foi detectada a presença do provável vetor desta espécie (*Lutzomyia antunesi*) em áreas de mata próxima a domicílios na zona rural da cidade de Manaus (80).

Câmara Coelho et al (2011), caracterizaram isolados de pacientes em Manaus e região metropolitana, quatro espécies de *Leishmania* foram encontradas: *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) naiffi* e *L. (L.) amazonensis*. O achado mais relevante deste estudo foi o alto percentual de

infecções mistas entre os pacientes, principalmente levando em conta que as espécies foram isoladas de amostras clínicas de uma única lesão (77).

Fagundes-Silva et al, relatam que a *L. (V.) naiffi* pode estar relacionada com um maior número de casos de leishmaniose do que se imagina. Trinta amostras de *Leishmania* foram isoladas de lesões cutâneas e, como esperado, a *L. (V.) guyanensis* foi a espécie mais comum encontrada. Entretanto foi observado um número relevante de pacientes com *L. (V.) naiffi* (8 casos). Neste estudo também foi identificada *L. (V.) shawi* como causador da doença em um indivíduo (79).

Em um ensaio clínico randomizado em que pacientes foram submetidos a tratamento com Miltefosina, em Manaus, foi realizada a tipagem de espécies e evidenciou-se um caso de *L. (V.) lainsoni*, até então, foi o único registro LC causada por esta espécie no Amazonas (78).

Ao realizar a caracterização de 90 cepas de *Leishmania* isoladas de pacientes do município de Rio Preto da Eva, Figueira et al identificaram *L. (V.) guyanensis* em 89% dos casos. Neste estudo também foram identificados *L. (L.) amazonensis* (7,8%) e *L. (V.) naiffi* (3,3%), sendo todos os casos descritos como a forma cutânea localizada da doença (81).

Guerra et al ao descrever a distribuição das espécies de *Leishmania* em pacientes com LM atendidos na FMT-HVD, concluíram que a *L. (V.) braziliensis* é a espécie predominante causadora dessa forma clínica no Amazonas, bem como na Região Amazônica. Neste estudo também foi possível evidenciar que a *L. (V.) guyanensis* também é um agente causador significativo de LM na região (27).

Com base nesses estudos em que foram realizadas a caracterização das espécies por métodos distintos, evidenciando-se que a *L. (V.) guyanensis* e *L.*

(V.) *braziliensis*, são as espécies mais frequentes no Amazonas são sendo as demais espécies com menor circulação no estado.

1.3 Justificativa

A leishmaniose é uma doença negligenciada e no Brasil a região norte responde pela maior parte da notificação de casos. Não são frequentes os estudos que visam identificar e compreender a distribuição das espécies de leishmanias causadoras das leishmanioses em humanos principalmente no Amazonas, e pouco se conhece a respeito de informações sobre o perfil clínico-epidemiológico dos pacientes infectados por espécies consideradas de baixa circulação na região.

Os métodos tradicionais de identificação de espécies apresentam limitações que comprometem a sensibilidade e especificidade destes ensaios, assim como o tempo prologando dos procedimentos. Nesse sentido, os métodos moleculares como o sequenciamento têm se tornado ferramentas precisas para caracterização de espécies de *Leishmania* nos últimos anos.

Diante destas problemáticas, faz-se necessária a realização de estudos que possam identificar espécies de leishmanias menos frequentemente envolvidas no ciclo de transmissão envolvendo o homem, bem como o esclarecimento do perfil clínico dos pacientes infectados por estas espécies, contribuindo para uma abordagem terapêutica adequada e para o entendimento da epidemiologia da leishmaniose no estado do Amazonas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a ocorrência de espécies de *Leishmania* de baixa circulação em casos de leishmaniose tegumentar, autóctones do Amazonas.

2.2 Específicos

- Estimar a frequência de espécies de *Leishmania* de baixa circulação em casos de leishmaniose tegumentar, autóctones do Amazonas;
- Descrever as características clínicas ocasionadas pelas espécies identificadas;
- Descrever a distribuição espacial dos casos por espécie identificada.

3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

Espécies de *Leishmania* de baixa circulação em pacientes com leishmaniose tegumentar autóctones do Amazonas

Denison Vital de Jesus¹, Felipe Jules Araújo dos Santos², Melissa de Souza Melo Cavalcante¹, Silmara Navarro Pennini^{1,2}, Luciana Mendes dos Santos³, Arineia Soares da Silva¹, André Luiz Letoriundo², Cynthia de Oliveira Ferreira^{1,2}, Cintia Mara Costa de Oliveira^{2,3}, Maria das Graças Vale Barbosa Guerra^{1,2}, Jorge Augusto de Oliveira Guerra^{1,4}

¹ Programa de pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas/ Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brasil

² Fundação Hospitalar Alfredo da Matta, Manaus, Brasil

³ Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil

⁴ Centro Universitário FAMETRO, Manaus, Brasil

Resumo

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma antroponose de alta endemicidade e um importante problema de saúde pública na região Amazônica. No estado do Amazonas, há registro da ocorrência de seis espécies de *Leishmania* causadoras de doença em humanos. Entretanto, a frequência e aspectos clínicos-epidemiológicos das infecções causadas por espécies de menor circulação, permanecem sem uma clara compreensão. Este projeto teve por objetivo investigar a ocorrência de espécies de *Leishmania* de baixa circulação em casos de leishmaniose tegumentar, autóctones do Amazonas. Foram analisadas amostras de tecido obtidos por biópsia cutânea e *imprints* em papel de filtro de 281 indivíduos com suspeita clínica ou com diagnóstico de LT atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) em Manaus, Amazonas. A identificação das espécies foi realizada por

meio de sequenciamento do gene *hsp70*. Foi possível identificar a espécie causadora de LT de 250 participantes, na qual foi observada uma frequência de 9,6% (24/250) de espécies de *Leishmania* de baixa circulação, representadas por *L. (V.) naiffi* 3,6% (9/250), *L. (L.) amazonensis* 3,2% (8/250) e *L. (V.) lainsoni* 2,8% (7/250). No total sete municípios foram identificados como locais de infecção da população de estudo: Manaus, Rio Preto da Eva, Presidente Figueiredo, Itapiranga, Novo Airão, Manaquiri e Manacapuru. Os pacientes da população de estudo não apresentaram características clínicas distintas em relação aos casos causados pelas espécies mais frequentes. Dentre as espécies de interesse neste estudo a *L. (V.) naiffi* foi a mais frequente e a *L. (V.) lainsoni* foi a que apresentou maior distribuição espacial na região estudada. Este foi o estudo que detectou o maior número de casos por *L. (V.) lainsoni* no estado, além de ser o primeiro a relatar a co-circulação de populações distintas dessa espécie. Por meio de dados moleculares apresentamos as primeiras evidências de cepas híbridas entre *L. guyanensis* e *L. shawi* isoladas de amostras humanas no estado do Amazonas. São necessários novos estudos para melhor compreensão da ecoepidemiologia e aspectos genéticos de *Leishmania* spp. no estado, tendo em vista que se trata de uma doença com capacidade de gerar impactos para a saúde pública em todo o estado.

Palavras chaves: leishmaniose humana, caracterização de espécies de *Leishmania*, espécies de baixa circulação.

Introdução

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos pela fêmea de insetos flebotomíneos podendo se manifestar nas formas visceral (LV) e tegumentar (LT) (1). A LT é a forma mais comum em todo mundo, estimando-se que 700.000 a 1,2 milhão de casos novos ocorram a cada ano (2). As apresentações clínicas recebem diferentes classificações, podendo ser subdivididas nas seguintes

formas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea ou mucosa (LM) (3).

A classificação taxonômica do gênero *Leishmania* é organizada nos níveis de subgênero, complexo de espécies, espécies e subespécies (4). Em todo mundo 53 espécies de *Leishmania* são descritas, destas 21 causam diferentes formas clínicas das leishmanioses em humanos (5). Nas Américas, já foram registradas 14 dessas espécies distribuídas desde os Estados Unidos ao Sul da Argentina, e no Brasil, sete espécies são causadoras de LT: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenbergi* (6,7).

No estado do Amazonas, com exceção da *L. (V.) lindenbergi*, já foram registradas todas as espécies circulantes no Brasil, sendo a *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* as mais frequentemente associadas as infecções humanas. As espécies *L. (V.) naiffi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) shawi* são esporadicamente citadas como espécies causando doença em baixa frequência de casos (8-11).

De maneira geral a identificação de espécies *Leishmania* é um trabalho desafiador por conta da proximidade genética entre as espécies, especialmente aquelas pertencentes ao mesmo subgênero (12). O método de eletroforese enzimática multilocus (MLEE) permanece sendo o padrão de referência para identificação das espécies, no entanto apresenta limitações importantes como necessidade de um grande painel de isoenzimas, isolamento prévio do parasito, aumentando consideravelmente seu tempo de execução (13).

Portanto, métodos moleculares tem se tornado cada vez mais relevantes devido a sua alta sensibilidade, especificidade e a possibilidade de aplicação em uma grande variedade de amostras clínicas. São baseados na detecção de sequências específicas de DNA do parasito, onde o sequenciamento de genes é uma das técnicas mais empregadas (14).

Não são frequentes os estudos que visam identificar e compreender a distribuição das espécies *Leishmania* causadoras das leishmanioses no Amazonas, pouco se conhece a respeito de informações sobre o perfil clínico-epidemiológico dos pacientes infectados por espécies de baixa circulação. A utilização de métodos de alta confiabilidade são de suma importância para a caracterização precisa das espécies. Nesse sentido a utilização de métodos moleculares como sequenciamento são de extrema importância para identificação de *Leishmania* spp.

Pelo exposto, são importantes estudos envolvendo métodos que detectem e identifiquem espécies de *Leishmania* causando doença no homem bem como o perfil clínico manifestado por essas espécies, contribuindo para uma abordagem terapêutica adequada e para o aprimoramento das medidas de controle. Este trabalho tem como objetivo investigar a ocorrência de espécies de *Leishmania* de baixa circulação em casos de leishmaniose tegumentar, autóctones do Amazonas.

Metodologia

Tipo de estudo e seleção de participantes

Trata-se de um estudo descritivo: retrospectivo e prospectivo que incluiu amostras de indivíduos oriundos do Amazonas, com suspeita ou diagnosticados com LT por exame parasitológico direto, que participaram de ensaios clínicos conduzidos no ambulatório de leishmaniose da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), em Manaus, Amazonas. O recrutamento dos participantes e coleta dos materiais biológicos ocorreram entre 2018 e 2022.

Coleta de amostras e dados gerais

As amostras foram coletadas por biópsia cutânea mantidas em microtubos de 1,5 mL contendo álcool 70% até o momento de seu uso, e amostras de

escarificado de lesão coletadas por impressão em papel filtro (*Imprint*), foram acondicionadas em envelope de plástico com lacre. Todas as amostras foram armazenadas em freezer -20°C, para posterior análise molecular. Os dados demográficos, clínicos e epidemiológicos, foram obtidos da ficha do participante, foram ainda, realizadas imagens das lesões.

Identificação de *Leishmania* spp.

A identificação das espécies de *Leishmania* foi realizada por sequenciamento do gene codificador da proteína do choque térmico 70 (*hsp70*). Os ensaios moleculares foram realizados no laboratório de biologia molecular da Fundação Hospitalar Alfredo da Matta (FUHAM) e Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Extração de DNA

Para a realização da extração do DNA de *Leishmania* foram seguidos protocolos distintos de acordo com a amostra clínica, utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN®), seguindo as orientações do fabricante, quantificado pelo Nanodrop Lite (Thermo Scientific®) onde também foi avaliado a sua pureza e posteriormente armazenado em freezer a -20°C até o momento da realização da PCR.

Sequenciamento

Na PCR usou-se os primers 5'– GGACGAGATCGAGCGCATGGT – 3' e 5' – ATATGTTAACGTCGATCGGCCT – 3' descritos por Graça et al. (2012) para amplificação da região C do *hsp70* (15). Os amplicons obtidos foram purificados pelo Kit ilustra™ (GE Life Sciences®) e posteriormente sequenciados utilizando os mesmos primers da PCR, além de 5,5 µL de água ultrapura HyClone™ (GE Life Sciences®), 0,5 µL de BigDye™ Terminator v3.1 (Applied Biosystems) e 2µL de tampão de sequenciamento (Applied Biosystems). A reação ocorreu no

termociclador Veriti (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 96°C por um minuto, seguidos de 25 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por dois minutos, seguidos de 15 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por três minutos. Após esse processo, os produtos da reação de sequenciamento foram ressuspendidos em formamida Hi-DiTM (Applied Biosystems) e submetidos a eletroforese capilar em analisador genético 3500 Di (Applied Biosystems) para obtenção das sequências de DNA.

Análises de dados

Os dados obtidos no estudo foram plotados em planilha do Microsoft Excel 2016®. As variáveis clínicas, epidemiológicas e demográficas dos participantes foram determinadas através do programa Stata/MP 13.0. O mapa da distribuição espacial das espécies foi elaborado através do programa QGIS 3.8.1. Informações adicionais sobre os participantes foram obtidos do prontuário eletrônico do sistema iDoctor da FMT-HVD.

Para análise das sequências obtidas no sequenciamento foi realizado um alinhamento utilizando o pacote de software (Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 4, Tamura et al., 2007, www.megasoftware.net) considerando as sequências dos primers *Forward* e *Reverse* de cada amostra. Antes das análises genéticas as sequências foram ajustadas através do mesmo software para garantir que apenas dados qualificados fossem analisados. As sequências consenso obtidas do alinhamento dos dois primers foram alinhadas com cepas referências descritas no **Quadro 1**. Além disso, as sequências foram submetidas a análise *in silico* pela ferramenta BLAST do Genbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para análise de homologia com outras espécies.

Quadro 1. Cepas utilizadas como referência na análise de sequenciamento.

| Espécie | Nome da cepa | País de origem | Número de acesso |
|--------------------------|--------------------------|----------------|------------------|
| <i>L. naiffi</i> | MDAS/BR/79/M5533 | Brasil | FR872767.1 |
| | MDAS/BR/1979/M5533 | Brasil | GU071183.1 |
| <i>L. amazonensis</i> | MHOM/BR/73/M2269 | Brasil | EU599090.1 |
| | MHOM/BR/77/LTB0016/C1S1 | Brasil | L14604.1 |
| <i>L. lainsoni</i> | MHOM/BO/95/CUM71 | Bolívia | FN395047.1 |
| | MHOM/PE/02/LH2344 | Peru | FN395049.2 |
| | MHOM/BR/2002/RBO027-P | Brasil | GU071179.1 |
| | MCUN/BR/85/M9342 | Brasil | LN907839.1 |
| <i>L. guyanensis</i> | MHOM/GF/85/LEM699 | Guiana FRA | FN395052.1 |
| | MHOM/BR/1975/M4147 | Brasil | GU071172.1 |
| | MHOM/BR/1997/NMT-MAO | Brasil | GU368211.1 |
| <i>L. panamensis</i> | MHOM/PA/94/PSC-1 | Panamá | CP009397.1 |
| | MHOM/PA/94/PSC-1 | Panamá | XM_010702330.1 |
| <i>L. braziliensis</i> | MCAN/PE/91/LEM2222 | Peru | FR715991.1 |
| | MHOM/PE/--/LH3851 | Peru | FR872763.1 |
| | Lb-A | Brasil | KY249628.1 |
| | PA/BR/2019/03L/HSP70-234 | Brasil | MZ399592.1 |
| <i>L. mexicana</i> | MHOM/PE/02/LH2312 | Peru | FN395038.1 |
| | MHOM/GT/2001/U1103 | Belize | XM_003877072.1 |
| <i>L. donovani</i> | DD8 | Índia | AY913842.2 |
| <i>Trypanosoma cruzi</i> | Mas cl1 | Brasil | KC959990.1 |

Considerações éticas

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, sob o CAAE: 44621321.6.0000.0005.

Resultados

Foram avaliadas 281 amostras de indivíduos com suspeita ou com diagnóstico positivo para LT e destas, em 250/281 (88,9%) foram identificadas cinco espécies de *Leishmania*, sendo quatro do subgênero *Viannia* (*L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. naiffi* e *L. lainsoni*) e uma ao subgênero *Leishmania* (*L. amazonensis*). *L. (V.) guyanensis* foi a mais frequente 207/250 (82,8%). Em 24/250 (9,6%) amostras encontraram-se espécies de *Leishmania* consideradas

de baixa circulação no Amazonas, sendo *L. (V.) naiffi* 3,6% (9/250), *L. (L.) amazonensis* 3,2% (8/250) e *L. (V.) lainsoni* 7/250 (2,8%) (**Tabela 1**).

Dentre os portadores de LT de interesse para o estudo 22/24 (91,7%) são homens, a distribuição da faixa etária variou de 18 a 65 anos com média de 37,7 anos, o grupo entre 18 e 30 anos foi o que representou a maior parte de casos 8/24 (33,3%). A maioria dos participantes 14/24 (58,3%) concluíram o ensino médio e 7/24 (29,2%) desenvolvem atividades como agricultores (**Tabela 2**).

Distribuição espacial das espécies

Os pacientes são procedentes de sete municípios da região metropolitana de Manaus identificados como locais prováveis de infecção, sendo Manaus o município de maior ocorrência 37,5% (9/24) dos casos, seguido dos municípios de Rio Preto da Eva com 29,1% (7/24), Presidente Figueiredo 12,4% (3/24) e Itapiranga 8,4% (2/24). Nos municípios de Novo Airão, Manauquiri e Manacapuru registrou-se um caso respectivamente, causado por *L. (V.) lainsoni* (**Tabela 3 e Figura 1**).

Tabela 1. Frequência das espécies de *Leishmania* identificadas por sequenciamento (hsp70) em 250 participantes.

| Espécie | N | % |
|-----------------------------|-----|------|
| <i>L. (V.) guyanensis</i> | 207 | 82,8 |
| <i>L. (V.) braziliensis</i> | 19 | 7,6 |
| <i>L. (V.) naiffi</i> | 9 | 3,6 |
| <i>L. (L.) amazonensis</i> | 8 | 3,2 |
| <i>L. (V.) lainsoni</i> | 7 | 2,8 |
| Total | 250 | 100 |

Tabela 2. Características sociodemográficas dos 24 participantes infectados por espécies de *Leishmania* de baixa circulação.

| Variáveis | Número de amostras (N=24) | Espécies de <i>Leishmania</i> identificadas | | |
|---------------------|---------------------------|---|-----------------------|--------------------|
| | | <i>L. naiffi</i> | <i>L. amazonensis</i> | <i>L. lainsoni</i> |
| Gênero | | | | |
| Masculino | 22 (91,6%) | 8 (33,3%) | 8 (33,3%) | 6 (25,0%) |
| Feminino | 2 (8,3%) | 1 (4,1%) | - | 1 (4,1%) |
| Faixa etária | | | | |
| 18 a 30 | 8 (33,3%) | 4 (16,6%) | 1 (4,1%) | 3 (12,5%) |
| 31 a 40 | 6 (25,0%) | 2 (8,3%) | 2 (8,3%) | 2 (8,3%) |
| 41 a 50 | 7 (29,1%) | 1 (4,1%) | 4 (16,6%) | 2 (8,3%) |
| 51 a 60 | 2 (8,3%) | 1 (4,1%) | 1 (4,1%) | - |
| > 60 | 1 (4,1%) | 1 (4,1%) | - | - |
| Escolaridade | | | | |
| Ens. fundamental | 2 (8,3%) | - | 1 (4,1%) | 1 (4,1%) |
| Ens. médio | 14 (58,3%) | 4 (16,6%) | 6 (25,0%) | 4 (16,6%) |
| Ens. superior | 3 (12,5%) | 2 (8,3%) | - | 1 (4,1%) |
| Não informado | 5 (20,8%) | 3 (12,5%) | 1 (4,1%) | 1 (4,1%) |
| Ocupação | | | | |
| Agricultor | 7 (29,2%) | 2 (8,3%) | 2 (8,3%) | 3 (12,5%) |
| Outros | 17 (70,8%) | 8 (33,3%) | 5 (20,8%) | 4 (16,6%) |

Tabela 3. Distribuição das espécies de *Leishmania* de baixa circulação, identificadas, segundo município de infecção dos participantes.

| Município | Espécies de <i>Leishmania</i> | | | Total |
|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------|-----------|
| | <i>L. naiffi</i> | <i>L. amazonensis</i> | <i>L. lainsoni</i> | |
| Manaus | 3 (12,5%) | 3 (12,5%) | 3 (12,5%) | 9 (37,5%) |
| Rio Preto da Eva | 3 (12,5%) | 3 (12,5%) | 1 (4,1%) | 7 (29,1%) |
| Presidente Figueiredo | 1 (4,1%) | 2 (8,3%) | - | 3 (12,4%) |
| Itapiranga | 2 (8,3%) | - | - | 2 (8,4%) |
| Novo Airão | - | - | 1 (4,1%) | 1 (4,1%) |
| Manaquiri | - | - | 1 (4,1%) | 1 (4,1%) |
| Manacapuru | - | - | 1 (4,1%) | 1(4,1%) |
| TOTAL | 9 (37,5%) | 8 (33,5%) | 7 (28,9%) | 24 (100%) |

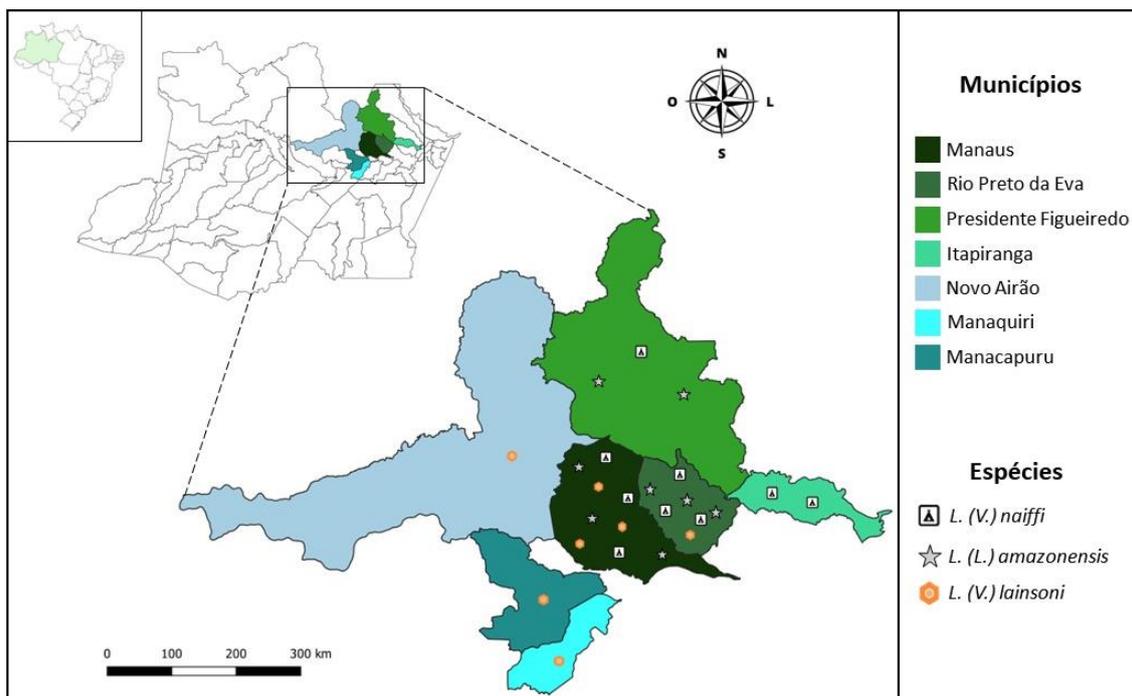


Figura 1. Distribuição espacial das espécies de *Leishmania* de baixa circulação identificadas, segundo município de infecção dos participantes.

Características clínicas

Todos os pacientes apresentaram lesões de aspecto ulcerado envolvendo principalmente áreas do corpo descobertas, sendo a maioria 14/24 (58,3%), nos membros superiores. Quando se avaliou o número de lesões por espécie, 18/24 (75%) dos casos apresentaram lesão única, e um caso (4,1%) infectado por *L. naiffi* apresentou 6 lesões distribuídas pelos membros inferiores. No tocante ao tamanho das lesões, 12/24 (50,0%) dos portadores, apresentaram lesões pequenas, com diâmetros que variaram entre 1 e 5 mm². Na análise do tempo de evolução das lesões, 19 (79,1%) relataram ter entre 30 e 60 dias evolução (Tabela 4).

Tabela 4. Características clínicas dos participantes infectados por espécies de *Leishmania* de baixa circulação, de acordo com as espécies identificadas.

| Variáveis | Número de amostras (N=24) | Espécies de <i>Leishmania</i> | | |
|---|---------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------|
| | | <i>L. naiffi</i> | <i>L. amazonensis</i> | <i>L. lainsoni</i> |
| Número de lesões | | | | |
| 1 | 18 (75,0%) | 6 (25,0%) | 7 (29,1%) | 5 (20,8%) |
| 2 a 5 | 5 (20,8%) | 2 (8,3%) | 1 (4,1%) | 2 (8,3%) |
| > 5 | 1 (4,1%) | 1 (4,1%) | - | - |
| Local da lesão | | | | |
| Membro superior | 14 (58,3%) | 6 (25,0%) | 4 (16,6%) | 4 (16,6%) |
| Membro inferior | 6 (25,0%) | 3 (12,5%) | 2 (8,3%) | 1 (4,1%) |
| Cabeça | 2 (8,3%) | - | 1 (4,1%) | 1 (4,1%) |
| Tronco | 2 (8,3%) | - | 1 (4,1%) | 1 (4,1%) |
| Diâmetro da lesão (mm²) | | | | |
| > 1 | 3 (12,5%) | 3 (12,5%) | - | - |
| 1 a 5 | 12 (50,0%) | 5 (20,8%) | 5 (20,8%) | 2 (8,3%) |
| 6 a 10 | 5 (20,8%) | - | 2 (8,3%) | 3 (12,5%) |
| > 10 | 2 (8,3%) | 1 (4,1%) | - | 1 (4,1%) |
| Sem dados | 2 (8,3%) | - | 1 (4,1%) | 1 (4,1%) |
| Tempo de evolução (dias) | | | | |
| > 30 | 3 (12,5%) | 1 (4,1%) | 1 (4,1%) | 1 (4,1%) |
| 30 a 60 | 19 (79,1%) | 8 (33,3%) | 5 (20,8%) | 6 (25,0%) |
| 61 a 90 | 1 (4,1%) | - | 1 (4,1%) | - |
| > 90 | 1 (4,1%) | - | 1 (4,1%) | - |

Discussão

Nesse estudo, registrou-se a ocorrência de três espécies de *Leishmania* consideradas de baixa frequência em amostras de pacientes portadores de LT, autóctones da Amazônia. O gene *hsp70* é considerado um dos melhores marcadores para identificação de espécies de uma parasitose cujo diagnóstico inicial é obtido através de escarificado da lesão, realizado no momento da triagem, permitindo a visualização das formas amastigotas do parasito, sem a identificação da espécie.

Alguns estudos têm demonstrado que o sequenciamento de amostras de pacientes portadores de LT, usando esse gene como alvo, apresenta maior resolução quando comparado com a metodologia do Mini-exon e ITS1 demonstrando um alto poder discriminatório tanto a nível intraespécies como interespécies, permitindo a detecção da variabilidade genética de espécies causadora da doença (16-19).

Sabe-se que as manifestações clínicas das leishmanioses são influenciados por fatores inerentes ao hospedeiro e a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (3). Nesse estudo a maioria dos casos foram pessoas expostas ao ciclo de transmissão, por residirem em áreas próximo à floresta, reconhecidas como áreas endêmicas de LT causada principalmente por *Leishmania guyanensis* (20, 21).

A *L. (V.) naiffi* registrada em 3,6% dos casos, já foi apontada como espécie não tão incomum na cidade de Manaus, baseando-se em caracterização bioquímica (MLEE), diferente do método aqui utilizado por sequenciamento do material genético do parasito (11). Considerada espécie que causa infecções de curso benigno com tendência abaixo grau de patogenicidade e cura espontânea, se manifesta em lesões pequenas e em baixa quantidade pelo corpo (12, 23). No entanto, nesse estudo embora não tenha sido identificada nenhuma complicação entre os casos, um paciente apresentou seis lesões distribuídas pelos membros inferiores, fato incomum para essa espécie (23). Ressalta-se que provavelmente essas lesões sejam resultado de múltiplas picadas de flebotomíneos (22).

A *L. (V.) lainsoni* foi a espécie menos frequente, mas, com maior distribuição espacial entre os municípios estudados. Grande parte dos casos causados por essa espécie foram em pessoas que realizavam atividades de lazer em áreas rurais, no entanto um caso foi registrado em área de mata na região periurbana de Manaus, zona leste. Guerra et al. (26) inferem a possibilidade de transmissão

no ambiente intra e peridomicílio, pela presença de animais domésticos que podem vir a atrair vetores e pela proximidade das residências com a mata.

Há poucas informações sobre dados clínicos e genéticos de LT causada por *L. (V.) lainsoni*, que no Amazonas até então havia sido descrita uma única vez por Chrusciak-Talhari et al (9), na ocasião a identificação da espécie foi realizada pela amplificação do gene *hsp70* seguido de PCR-RFLP. Essa espécie apresenta características biológicas e moleculares distintas do subgênero *Viannia*, conforme demonstrado nos estudos de Fernandes et al. e Fraga et al. (24,25).

Nesse estudo observamos a existência de polimorfismos intraespecíficos nos sete isolados identificados como *L. (V.) lainsoni*, isso indica a presença de subpopulações dessa espécie circulante na região estudada. Utilizando como referência a sequência da cepa L14604.1 (3.140 pb) conseguimos alinhar e identificar a posição desses polimorfismos no gene *hsp70*, que estavam presentes nas posições 1818, 1826 e 1865 desse gene.

Ao realizar a análise das sequências das amostras definidas como *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lainsoni*, verificamos que todas possuíam uma substituição de Timina para Adenina nas posições 1924 e 1922 do gene *hsp70*, respectivamente. Isso indica uma peculiaridade genética das leishmanias circulantes no Amazonas, uma vez que esses polimorfismos não estão presentes nas sequências das cepas disponíveis no GenBank. Esse achado reforça a importância da utilização do sequenciamento de genes na identificação de *Leishmania* spp., pois possibilita a detecção de variabilidade genética entre espécies que circularam em diferentes regiões geográficas.

Ducharme et al (2020) relatam que grande parte dos pacientes infectados com *L. (V.) naiffi* na Guiana Francesa adquiriram a infecção durante atividades de lazer em áreas antropizadas, enquanto pacientes infectados por *L. (V.) lainsoni* parecem ter adquirido durante atividades profissionais em regiões de floresta

primária (27). Em nosso estudo, os participantes infectados por *L. (V.) naiffi* apresentaram o mesmo padrão, com apenas 22% dos casos ligados a atividade profissional. Já nos casos de *L. (V.) lainsoni*, 43% foram relacionados com atividades ocupacionais.

Dentre as seis espécies de *Leishmania* registradas no Amazonas, a única não identificada nesse estudo foi a *L. (V.) shawi*. Porém, relatamos que seis isolados foram definidos como *L. guyanensis/L. shawi*, de acordo com os resultados obtidos no GenBank, o que leva a hipótese da existência cepas híbridas entre essas duas espécies na região. Esse achado vai de acordo com relatos recentes de Lima et al (2021) que confirmou através de dados moleculares que algumas linhagens de *Leishmania* da região Amazônica brasileira são híbridos para *L. guyanensis* e *L. shawi* (28).

Os primeiros registros de parasitos híbridos entre *L. guyanensis* e *L. shawi* na Amazônia brasileira foram feitos por Jennings et al (2014), os resultados obtidos por caracterização enzimática mostraram que a região do baixo Amazonas (oeste do estado do Pará) representa um bioma onde *L. guyanensis* e *L. shawi* trocam informações genéticas (29).

Dentre as espécies de interesse para este estudo, a *L. (V.) amazonensis* é a que apresenta maior distribuição geográfica no Brasil e nas Américas (7,30). É responsável por um grande espectro de manifestações clínicas, podendo causar desde formas simples localizada até formas difusas extremamente graves (31). Em nosso estudo oito pacientes foram encontrados infectados por essa espécie, todos apresentando a forma cutânea localizada da doença.

Grande parte dos pacientes infectados por *L. (V.) amazonensis* foram infectados em áreas próximas a rodovia AM 010, entre Manaus e Rio Preto da Eva. Figueira et al (2014) também relataram a presença dessa espécie nessa região, principalmente em áreas próximas ao assentamento Iporá, onde foi encontrado

com abundância a *Lu. flaviscutellata*, seu principal vetor, em ambientes silvestre e peridomicílio (10,32).

Em relação a técnica utilizada para detecção do material genético nas amostras clínicas a PCR apresentou uma sensibilidade de 94,6% e 96,0% para as amostras de *imprint* e biópsia, respectivamente. Esses achados diferem dos resultados apresentados por Moraes et al (2020), na qual o *Imprint* foi a amostra mais sensível (83,06% de sensibilidade) quando comparado com amostras de biópsia (72,72% de sensibilidade) analisadas por PCR em tempo real (33). Neste estudo apesar das amostras de *imprint* terem apresentado sensibilidade ligeiramente inferior quando comparadas as amostras de biópsia, esse método de coleta possui grande utilidade, uma vez que é um método simples, menos invasivo, de baixo custo e que apresenta maior aceitação pelos pacientes.

Ressalta-se a importância de novos estudos moleculares para melhores esclarecimentos da ecoepidemiologia de *Leishmania* spp., incluindo regiões mais distantes da capital, uma vez que se trata de uma doença que gera impactos para a saúde pública.

Referências

1. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. Lancet. 2018; 392 (10151): 951–70.
2. Organization WH. Leishmaniasis [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 1]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
3. Mokni M. Cutaneous leishmaniasis. Ann Dermatol Venereol [Internet]. 2019;146(3):232–46. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annder.2019.02.002>.
4. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. Mol Aspects Med

- [Internet]. 2017 Oct;57:1–29. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299716300450>.
5. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):1–40.
 6. OPAS. Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas, dezembro 2020 [Internet]. 2020. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/5309>.
 7. Brasil. Ministério da Saúde. Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. 2017. 189 p.
 8. Camara Coelho LI, Paes M, Guerra JA, Barbosa MDG, Coelho C, Lima B, et al. Characterization of Leishmania spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res*. 2011;108(3):671–7.
 9. Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Talhari CC, Da Silva RM, Yamashita EPG, De Oliveira Penna G, et al. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) guyanensis in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(2):255–60.
 10. Figueira L de P, Soares FV, Farias Naiff M de, Da Silva SS, Espir TT, Pinheiro FG, et al. Distribuição De Casos De Leishmaniose Tegumentar No Município De Rio Preto Da Eva, Amazonas, Brasil. *Rev Patol Trop*. 2014;43(2):173–81.
 11. Fagundes-Silva GA, Sierra Romero GA, Cupolillo E, Gadelha Yamashita EP, Gomes-Silva A, De Oliveira Guerra JA, et al. Leishmania (Viannia) naiffi: Rare enough to be neglected? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(6):797–800.
 12. Schnian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of Leishmania. *Parasitology*. 2011;138(4):405–25.

13. Boerlin P. Applications of multilocus enzyme electrophoresis in medical microbiology. *J Microbiol Methods*. 1997;28(3):221–31.
14. Van Der Auwera G, Ravel C, Verweij JJ, Bart A, Schoñian G, Felger I. Evaluation of four single-locus markers for leishmania species discrimination by sequencing. *J Clin Microbiol*. 2014;52(4):1098–104.
15. Graça GC, Volpini AC, Romero GAS, Neto MP de O, Hueb M, Porrozzi R, et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(5):664–74.
16. Auwera G Van der, A B, Chicharro C, Cortes S, Davidsson L, Muccio T Di, et al. Comparison of Leishmania typing results obtained from 16 European clinical laboratories in 2014. *Euro Surveill [Internet]*. 2016;21 (49):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.49.30418>.
17. Patiño LH, Castillo-Castañeda AC, Muñoz M, Jaimes JE, Luna-Niño N, Hernández C, et al. Development of an Amplicon-Based Next-Generation Sequencing Protocol to Identify Leishmania Species and Other Trypanosomatids in Leishmaniasis Endemic Areas . *Microbiol Spectr*. 2021;9(2):1–15.
18. Folgueira C, Requena JM. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol Rev*. 2007;31(4):359–77.
19. Silva LA, de Sousa C dos S, da Graça GC, Porrozzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying Leishmania species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol*. 2010;10(1):77–83.
20. Guerra JA de O, Maciel MG, Guerra MV de F, Talhari AC, Prestes SR, Fernandes MA, et al. Tegumentary leishmaniasis in the state of Amazonas: What have we learned and what do we need? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(December 2013):12–9.
21. Guerra JA de O, Barbosa M das GV, Loureiro AC de SP, Coelho CP, Rosa GG, Coelho LI de A da CR. Leishmaniose tegumentar americana em crianças: aspectos epidemiológicos de casos atendidos em Manaus, Amazonas, Brasil. *Cad Saude Publica*. 2007;23(9):2215–23.

22. FIGUEIRA L de P, SOARES FV, JÚNIOR RDN, VINHOTE-SILVA AC, SILVA SS da, ESPIR TT, et al. New human case reports of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) naiffi* in the Amazon region, Brazil. *Acta Amaz.* 2017;47(1):47–52.
23. Naiff RD, Freitas RA, Naiff MF, Arias JR, Barrett T V., Momen H, et al. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. Vol. 86, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1991. p. 317–21.
24. Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degraeve WM, Campbell DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;66(2):261–71.
25. Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol.* 2010;10(2):238–45.
26. Oliveira Guerra JA, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI de ARC, Gama P, Moura A, et al. Mucosal leishmaniasis caused by *leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(3):1–6.
27. Ducharme O, Simon S, Ginouves M, Prévot G, Couppie P, Demar M, et al. *Leishmania naiffi* and *lainsoni* in french guiana: Clinical features and phylogenetic variability. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(8):1–17.
28. Lima ACS, Gomes CMC, Tomokane TY, Campos MB, Zampieri RA, Jorge CL, et al. Molecular tools confirm natural *leishmania (Viannia) guyanensis*/l. (v.) *shawi* hybrids causing cutaneous leishmaniasis in the amazon region of brazil. *Genet Mol Biol.* 2021;44(2).
29. Jennings YL, De Souza AAA, Ishikawa EA, Shaw J, Lainson R, Silveira F. Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. Causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania (Viannia) guyanensis* × *Leishmania (Viannia) shawi shawi*. *Parasite.* 2014;21.

30. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*. 2017;10(1):1–10.
31. Barral A, Sampaio DP, Jr. GG, Momen H, McMahon-Pratt D, Jesus AR de, et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;44(5):536–546.
32. Pereira AMRF, Pereira MA da S, Freitas RA. Diversidade da fauna de flebotomíneos em área de assentamento no município de Rio Preto da Eva, estado do Amazonas. *Entomol na Amaz Bras*. 2010;183.
33. Morais RCS de, Melo MGN de, Goes TC de, Pessoa e Silva R, Morais RF de, Guerra JA de O, et al. Duplex qPCR for *Leishmania* species identification using lesion imprint on filter paper. *Exp Parasitol*. 2020;219(October).

4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

Este trabalho inclui amostras de pacientes de sete municípios do Amazonas, todos da região metropolitana de Manaus. Portanto tem-se como limitação a falta de amostras de pacientes de municípios mais distantes, como é o caso da região do Alto Rio Negro.

Parte dos participantes inclusos neste estudo foram de estudos em andamento ou já finalizado, impossibilitando (em alguns casos) a obtenção de imagens de lesões além de dados clínicos e epidemiológicos, sendo alguns resgatados no sistema de prontuário médico da FMT-HVD.

Em muitos casos, os pacientes que apresentavam mais de uma lesão, foi realizada a coleta de apenas uma delas, diminuindo significativamente a chance de se detectar mais de uma espécie infectando o mesmo paciente.

Investigações mais detalhadas sobre a ecoepidemiologia e genética da *Leishmania* spp. no estado trará importantes informações para o entendimento das manifestações clínicas, principalmente quando se utiliza ferramentas moleculares e alvos precisos para a especiação desse parasito.

5. CONCLUSÃO

Foi possível observar que a frequência das espécies de *Leishmania* de baixa circulação no Amazonas permaneceu nos padrões descritos pela maioria dos estudos anteriores.

Este foi o estudo que detectou o maior número de casos por *L. (V.) lainsoni* no estado, além de apresentar os primeiros relatos de circulação de subpopulações dessa espécie no estado. Essa espécie também apresentou a maior distribuição espacial na região estudada.

Através de dados moleculares apresentamos as primeiras evidências de cepas híbridas entre *L. guyanensis* e *L. shawi* isoladas de amostras humanas no estado do Amazonas.

Assim como nos casos causados pelas espécies mais frequentes, grande parte dos casos da população de estudo foram de homens em idade produtiva. Não foi observada diferenças clínicas significativas entre as espécies identificadas neste estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018;392(10151):951–70.
2. Ribeiro; DH, Moraes CC de, Kataguirí S. Risk factors, control and prophylaxis of american cutaneous leishmaniasis in the municipality of Nobres – Mato Grosso. *Brazilian J Heal Rev*. 2018;81–95.
3. Organization WH. Leishmaniasis [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 1]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
4. Löwy I. The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases. *Med Hist*. 1997;4(41):502–3.
5. Leishman WB. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Br Med J*. 1903;1(2213):1252–4.
6. Donovan C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903. *Natl Med J India*. 1994;7(4):196.
7. Wright JH. Protozoa in a case tropical ucer (“Delhi Sori”). *J Med Res*. 1903;10:472.
8. Bari A ul. Chronology of cutaneous leishmaniasis: An overview of the history of the disease. *J Pakistan Assoc Dermatologists*. 2006;16:24–7.
9. Benchimol JL, Da Costa Gualandi F, Dos Santos Barreto DC, De Araujo Pinheiro L. Leishmaniasis: Historical configuration in Brazil with an emphasis on the visceral disease, from the 1930s to the 1960s. *Bol do Mus Para Emilio Goeldi Ciências Humanas*. 2019;14(2):611–26.

10. Vale ECS do, Furtado T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *An Bras Dermatol*. 2005;80(4):421–8.
11. Furtado TA. Leishmaniose tegumentar americana. *Doenças Infecc com manifestações dermatológicas*. 1994;319–29; 334–6.
12. Shaw JJ. Taxonomia do gênero *Leishmania*. *An Bras Dermatol*. 1985;(60):67–72.
13. Miles MA, Miles MA, Lainson R, Shaw JJ, Povoá M, De Souza AA. Leishmaniasis in Brazil: Xv. biochemical distinction of *Leishmania mexicana amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis* and *L. braziliensis guyanensis*—aetiological agents of cutaneous leishmaniasis in the Amazon basin of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1981;75(4):524–9.
14. Wirth DF, McMahon Pratt D. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(22 I):6999–7003.
15. McMahon-Pratt D, Bennett E, David JR. Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of *Leishmania braziliensis*. *J Immunol*. 1982;(129):926-7).
16. Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, et al. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;(49):348–56.
17. Dye C. The leishmaniasis in biology and medicine. Vol. 4, *Parasitology Today*. 1988. 28 p.
18. Jennings YL, De Souza AAA, Ishikawa EA, Shaw J, Lainson R, Silveira F. Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. Causing cutaneous

- leishmaniasis in the lower Amazon region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania (Viannia) guyanensis* × *Leishmania (Viannia) shawi shawi*. *Parasite*. 2014;21.
19. Reithinger R, Dujardin J-C, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet*. 2007;7.
 20. Blum J, Buffet P, Visser L, Harms G, Bailey MS, Caumes E, et al. LeishMan recommendations for treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis in travelers, 2014. *J Travel Med*. 2014;21(2):116–29.
 21. Mokni M. Cutaneous leishmaniasis. *Ann Dermatol Venereol* [Internet]. 2019;146(3):232–46. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annder.2019.02.002>
 22. Bilgic-Temel A, Murrell DF, Uzun S. Cutaneous leishmaniasis: A neglected disfiguring disease for women. *Int J Women's Dermatology* [Internet]. 2019;5(3):158–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2019.01.002>
 23. Uzun S, Gürel MS, Durdu M, Akyol M, Fettahlioğlu Karaman B, Aksoy M, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis in Turkey. *Int J Dermatol*. 2018;57(8):973–82.
 24. Costa JML, Costa AAUML, Elkhoury AN, Bezerril ACR, Barral A, Saldanha ACR. Leishmaniose Cutânea Difusa (Lcd) No Brasil Após 60 Anos De Sua Primeira Descrição. *Gaz Médica da Bahia*. 2009;0(79):16–24.
 25. Diniz JLCP, Costa MO da R, Gonçalves DU. Mucocutaneous leishmaniasis: Clinical markers in presumptivediagnosis. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2011;77(3):380–4.
 26. Marsden P. Letter from Brasilia : Mucocutaneous leishmaniasis. *BMJ Br*

- Med J (International ed). 1990;301(6753):656–7.
27. de Oliveira Guerra JA, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI de ARC, Gama P, Moura A, et al. Mucosal leishmaniasis caused by leishmania (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):1–6.
 28. Lessa MM, Lessa HA, Castro TWN, Oliveira A, Machado P, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. 2007;73(6):843–7.
 29. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar. Minist da saude. 2017;192.
 30. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):1–40.
 31. Lainson R, Shaw J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W; KILLICK-KENDRICK, R. *The leishmaniasis in biology and medicine*. Biology an. 1987. 1–120 p.
 32. Sunter J, Gull K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol*. 2017;7(9).
 33. Singla L Das. Leishmaniasis. In: *Zoonose: Doenças Parasíticas e Micóticas*. 2014. p. 134–47.
 34. Neves DP. *Parasitologia Humana*. 11th ed. 2011. 50 p.
 35. Brasil. Ministério da Saúde. Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. 2017. 189

p.

36. Galati EAB. Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas. Programa Pós-Graduação em Saúde Pública Fac Saúde Pública da Univ São Paulo, São Paulo [Internet]. 2018;1:1–139. Available from: <http://www.fsp.usp.br/~egalati/>
37. Shaw JJ, Rangel EF. Brazilian sand flies: Biology, taxonomy, medical importance and control. *Brazilian Sand Flies: Biology, Taxonomy, Medical Importance and Control*. 2018. 1–494 p.
38. Justiniano, Chagas, Pessoa, Queiroz. *Lutzomyia umbratilis* (DIPTERA : PSYCHODIDAE) OF CENTRAL AMAZONIA , BRAZIL , UNDER LABORATORY CONDITIONS. 2004;64(2):227–35.
39. Pereira Júnior AM, Souza ABN, Castro TS, da Silva MS, de Paulo PFM, Ferreira GEM, et al. Diversity, natural infection and blood meal sources of phlebotomine sandflies (Diptera, psychodidae) in the western Brazilian amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019;114(6):1–9.
40. Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: Aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(7):937–54.
41. Lainson R, Shaw J, Silveira F, Souza A, Braga R, Isshikawa E. The Dermal Leishmaniasis of Brazil, with Special Reference to the Eco-epidemiology of the Disease in Amazonia. *Memórias Inst Oswaldo Cruz*. 1994;89(3):435–43.
42. De Brito RCF, Aguiar-Soares RD de O, Cardoso JM de O, Coura-Vital W, Roatt BM, Reis AB. Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104(19):8105–16.

43. Aronson NE, Joya CA. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2019;33(1):101–17. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.004>
44. Mouri O, Morizot G, Van der Auwera G, Ravel C, Passet M, Chartrel N, et al. Easy Identification of Leishmania Species by Mass Spectrometry. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(6).
45. de Vries HJC, Reedijk SH, Schallig HDFH. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *Am J Clin Dermatol*. 2015;16(2):99–109.
46. Thakur S, Joshi J, Kaur S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *J Parasit Dis* [Internet]. 2020;44(2):253–72. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01212-w>
47. van der Auwera G, Dujardina JC. Species typing in dermal leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(2):265–94.
48. Galluzzi L, Ceccarelli M, Diotallevi A, Menotta M, Magnani M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1):1–13.
49. Sudarshan M, Singh T, Chakravarty J, Sundar S. A correlative study of splenic parasite score and peripheral blood parasite load estimation by quantitative PCR in visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2015;53(12):3905–7.
50. Ben Abda I, De Monbrison F, Bousslimi N, Aoun K, Bouratbine A, Picot S. Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous Leishmania species in Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*.

2011;105(1):17–22.

51. Espada CR, Ortiz PA, Shaw JJ, Barral AMP, Costa JML, Uliana SRB, et al. Identification of *Leishmania* (*Viannia*) species and clinical isolates of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* from Brazil using PCR-RFLP of the heat-shock protein 70 gene reveals some unexpected observations. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018;4(91):312–8.
52. Jara M, Aduai V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, 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. *J Clin Microbiol*. 2013;51(6):1826–33.
53. Tsukayama P, Núñez JH, De Los Santos M, Soberón V, Lucas CM, Matlashewski G, et al. A FRET-Based Real-Time PCR Assay to Identify the Main Causal Agents of New World Tegumentary Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1).
54. Van Der Auwera G, Ravel C, Verweij JJ, Bart A, Schoñian G, Felger I. Evaluation of four single-locus markers for *leishmania* species discrimination by sequencing. *J Clin Microbiol*. 2014;52(4):1098–104.
55. Ovalle-Bracho C, Camargo C, Díaz-Toro Y, Parra-Muñoz M. Molecular typing of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and species of the subgenus *Viannia* associated with cutaneous and mucosal leishmaniasis in Colombia: A concordance study. *Biomedica*. 2018;38(1):86–95.
56. Boerlin P. Applications of multilocus enzyme electrophoresis in medical microbiology. *J Microbiol Methods*. 1997;28(3):221–31.
57. Schnian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology*. 2011;138(4):405–25.

58. Ghorbani M, Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:25–40.
59. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 2003;19(11):502–8.
60. Organization world health. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 1]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9525>
61. World Health Organization. Global leishmaniasis surveillance: 2019-2020, a baseline for the 2030 roadmap. *Relev épidémiologique Hebd* [Internet]. 2021;35:19. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9635-401-419>
62. DNDi. Leishmaniose [Internet]. 2021. Available from: <https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/>
63. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012;7(5).
64. OPAS. Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas, dezembro 2020 [Internet]. 2020. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>
65. Brasil. Ministério da Saúde. Guia de vigilância em saúde. 2010;Único:469.
66. SINAN. Leishmaniose tegumentar americana - casos confirmados notificados [Internet]. 2021. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>

67. Guerra JA de O, Maciel MG, Guerra MV de F, Talhari AC, Prestes SR, Fernandes MA, et al. Tegumentary leishmaniasis in the state of Amazonas: What have we learned and what do we need? *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(December 2013):12–9.
68. Guerra JA de O, Barbosa M das GV, Paes MG, Souza RT de, Silva PG da, Silva MJ, et al. Mucosal Leishmaniasis – Clinical and Epidemiological Aspects of 234 Cases Treated in a Tertiary Reference Center in the Brazilian Amazon. *J Community Med Health Educ.* 2011;01(02):2–5.
69. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors.* 2017;10(1):1–10.
70. Brito MEF, Andrade MS, Mendonça MG, Silva CJ, Almeida EL, Lima BS, et al. Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Trop Med Int Heal.* 2009;14(10):1278–86.
71. Cantanhêde LM, Fernandes FG, Eduardo Melim Ferreira G, Porrozzi R, De Godoi Mattos Ferreira R, Cupolillo E. New insights into the genetic diversity of *Leishmania* RNA Virus 1 and its species-specific relationship with *Leishmania* parasites. *PLoS One.* 2018;13(6):1–16.
72. Gontijo B, De Carvalho M de LR. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(1):71–80.
73. Dorval MEMC, Oshiro ET, Cupollilo E, Castro ACC de, Alves TP. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(1):43–6.
74. Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis. *Topley Wilson's Microbiol Microb Infect.* 2005;

75. Silveira FT, Ishikawa EAY, De Souza AAA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. . *Parasite*. 2002;9(1):43–50.
76. Cantanhêde LM, Mattos CB, De Souza Ronconi C, Filgueira CPB, Da Silva Júnior RF, Limeira C, et al. First report of *Leishmania (Viannia) lindenbergi* causing tegumentary leishmaniasis in the Brazilian western Amazon region. *Parasite*. 2019;26.
77. Camara Coelho LI, Paes M, Guerra JA, Barbosa MDG, Coelho C, Lima B, et al. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res*. 2011;108(3):671–7.
78. Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Talhari CC, Da Silva RM, Yamashita EPG, De Oliveira Penna G, et al. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(2):255–60.
79. Fagundes-Silva GA, Sierra Romero GA, Cupolillo E, Gadelha Yamashita EP, Gomes-Silva A, De Oliveira Guerra JA, et al. *Leishmania (Viannia) naiffi*: Rare enough to be neglected? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(6):797–800.
80. Chagas ECDS, Silva AS, Fé NF, Ferreira LS, Sampaio VDS, Terrazas WCM, et al. Composition of sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) and detection of *Leishmania* DNA (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in different ecotopes from a rural settlement in the central Amazon, Brazil. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1):1–10.
81. Figueira L de P, Soares FV, Farias Naiff M de, Da Silva SS, Espir TT, Pinheiro FG, et al. Distribuição De Casos De Leishmaniose Tegumentar

No Município De Rio Preto Da Eva, Amazonas, Brasil. Rev Patol Trop.
2014;43(2):173–81.

7. APÊNDICES

7.1 Termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE

**Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado - Gerência de Leishmaniose
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
PROJETO: INVESTIGAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE ESPÉCIES DE *Leishmania* DE BAIXA
CIRCULAÇÃO EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AUTOCTONES DO
AMAZONAS**

Responsável: Denison Vital de Jesus

Av. Pedro Teixeira, 25 D. Pedro Manaus-AM 69040000 (92)2127 3555, (92) 99988 3215, 2127 3518.
Comitê de Ética em Pesquisas da FMTHVD Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado
Horário de funcionamento: Segunda a sexta e 8:00 às 13:00h Av. Pedro Teixeira, 25 D. Pedro Manaus-AM 69040000
Fone: 2127 3555

Nome do Paciente: _____ N° Prontuário: _____

1. Convite e Propósito do Estudo:

Estamos convidando você para participar de um estudo sobre a leishmaniose que será realizado na Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). O objetivo deste estudo é estudar a frequência e o perfil clínico epidemiológico de leishmaniose cutânea causada por espécies de *Leishmania* de baixa frequência no estado do Amazonas e saber como ela se apresenta clinicamente na pessoa. Sua participação neste estudo será importante porque você apresenta essa doença e é importante saber qual é espécie do parasita está causando essa doença em você, onde estão circulando e como a doença se comporta nas pessoas.

2. Para ser lido por todos os participantes do estudo:

As informações a seguir vão descrever o estudo e a forma como você vai participar. O investigador responderá quaisquer perguntas que você possa fazer sobre o estudo. Esse documento tem duas vias, e uma delas ficará com você.

3. Procedimentos do Estudo

Depois de ler este consentimento na sala de consulta, uma história médica com preenchimento de ficha será realizada. Após isso, vamos realizar uma raspagem da sua lesão e colocar em um papel filtro, para depois realizar testes no laboratório e saber qual espécie do parasita está causando a doença. O procedimento de raspagem será feito por técnicos do laboratório de leishmaniose e pelo responsável do estudo. Essa coleta será realizada no mesmo momento da coleta do exame direto para saber se você tem a doença ou não. Além disso, vão ser feitas imagens das feridas, entretanto no sentido de resguardar sua privacidade, essas imagens não vão permitir que você seja identificado. Em casos de fotos de lesões no seu rosto será tarja preta vedando seus olhos para ocultar sua identificação. Sua participação inicial no projeto será apenas essa, mas vamos lhe entregar o resultado do seu exame assim que tiver pronto.

Todo material coletado será utilizado nesse estudo, mas poderá ser reutilizada em outros estudos que envolvem essa doença que você tem. Queremos deixar claro que isso só irá acontecer com a sua permissão, ou seja, após você assinar esse documento. Em caso desse material ser reutilizado em outras pesquisas entraremos em contato com você para informá-lo e pedir a permissão novamente.

Participação Voluntária:

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode recusar a participar ou desistir da participação a qualquer momento que você assim decidir. Sua recusa em participar do estudo não afetará de modo algum qualquer tratamento que você precise na FMT-HVD. Isto também não vai prejudicar suas futuras relações com a FMT-HVD e com os médicos que lhe atenderam.

4. Confidencialidade:

Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial (ou seja, em momento algum seu nome ou dados serão revelados a não ser para equipe da pesquisa) sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe científica. Os resultados deste estudo serão divulgados na forma de comunicação científica (publicação em congressos e revistas científicas), não permitindo a identificação individual dos participantes.

5. Análises de riscos e benefícios:

Riscos: O método de raspagem da lesão é realizado na rotina de diagnóstico da leishmaniose cutânea. Esse procedimento pode causar dor, incomodo e sangramento em pequena quantidade no local da lesão. Os materiais utilizados no procedimento são estéreis, obedecendo normas de segurança e higiene para evitar infecções no local da lesão. Em caso de danos decorrentes da sua participação no estudo, você (e seu acompanhante, se for o caso) terá direito a indenizações pela FMT-HVD, ou ressarcimento dos seus gastos (como por exemplo despesas com alimentação e transporte, quando necessário) e também assistência médica integral e gratuita dada pela FMT-HVD, e será atendido quer seja no ambulatório, na enfermaria ou no pronto socorro da Fundação, pelo tempo que for necessário e será tratado com medicamentos ou procedimentos adequados para cada caso pelos médicos responsáveis integrantes do estudo, sem nenhum custo para você.

Benefícios: participando desse estudo você não receberá nenhum benefício direto, no entanto você vai estar contribuindo para o conhecimento das que causam essa doença. Dessa forma você vai estar ajudando outras pessoas que poderão ter essa doença.

6. Custos:

Você não receberá pagamento por sua participação no estudo. Caso você apresente qualquer problema associado a esta pesquisa, a FMT-HVD lhe dará toda assistência médica necessária em Manaus. Informações adicionais podem ser obtidas na Gerência de Leishmaniose da FMT-HVD com Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra. Tel: (92)99988-3215, (92)2127-3555, (92)2127 3518 ou Denison Vital de Jesus, Tel. (92)99465-2214, das segundas às sextas-feiras, das 8 às 11 horas, ou em qualquer momento de necessidade.

7. Esclarecimentos de contatos

Se você tiver qualquer outra questão sobre a sua participação nesta pesquisa, por favor contate o Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra ou Denison Vital de Jesus, nos telefones acima ou o Comitê de Ética em Pesquisa da FMTHVD. Pedro Teixeira, 25 D. Pedro Manaus-AM 69040000. Horário de funcionamento: Segunda a sexta e 8:00 às 14:00h, Fone: 2127 3572, cuja presidente é Dra. Marilene Martins, onde poderão ser esclarecidas suas dúvidas.

8. Consentimento:

Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor rubricar todas as páginas e assinar o nome abaixo. **A você será entregue uma via original deste documento para guardar e a outra ficará com o pesquisador. O pesquisador também rubricará todas as páginas e assinará esse consentimento.**

Sim, eu concordo em participar do estudo e que a amostra coletada seja armazenada e reaproveitada para novos estudos.

Sim, eu concordo em participar do estudo, mas não desejo que a amostra coletada seja armazenada e reaproveitada para novos estudos.

Assinatura do Participante: _____ Data: __/__/__ Hora: __:__

Assinatura da Testemunha: _____ Data: __/__/__ Hora: __:__

Assinatura do Pesquisador: _____ Data: __/__/__ Hora: __:__

7.2 Ficha clínica do participante

PROJETO: INVESTIGAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE ESPÉCIES DE *Leishmania* DE BAIXA CIRCULAÇÃO EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AUTOCTONES DO AMAZONAS

Dados gerais

Contato: _____ Nº Prontuário: _____ Data da coleta: ___/___/___

Participante: _____

Data de nasc.: ___/___/___ Idade: ___ anos Sexo: Mas. Fem.

Endereço: _____

Nº de lesões: _____ Aspecto da lesão: _____

Tamanho da lesão (mm³): _____

Local da lesão: () MS () MI () cabeça () Pescoço () Tronco

Prov. local de infecção: _____

Ocupação: _____

Escolaridade: () Analfabeto () Ens. fund. () Ens. médio () Ens. sup.

7.3 Parecer cosubstanciado do comitê de ética em pesquisa – CEP

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADOS POR ESPÉCIES DE LEISHMANIA DE BAIXA CIRCULAÇÃO EM PACIENTES DO ESTADO DO AMAZONAS

Pesquisador: DENISON VITAL DE JESUS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 44621321.6.0000.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.683.242

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos contendo as Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1711234.pdf postada em 17/03/2021 e PROJETO_LEISHDENISON_2021.pdf, postada em 17/03/2021).

RESUMO

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma importante zoonose endêmica na região Amazônica que apresenta grande diversidade em sua epidemiologia, além de manifestações clínicas multifacetadas resultantes de fatores presente no hospedeiro. No Amazonas seis espécies de

Leishmania já foram descritas como causadoras de leishmaniose cutânea (LC) em humanos, ainda são poucas as informações quanto a morbidade e prognóstico das infecções causadas por espécies em menor circulação, bem como a distribuição destas na região. Este projeto tem por objetivo estudar a frequência e o perfil clínico epidemiológico de leishmaniose cutânea causada por espécies de Leishmania de baixa circulação em pacientes do estado do Amazonas. Trata-se de um estudo prospectivo descritivo em que serão incluídos pacientes com LC confirmada através de exame parasitológico direto atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 4.683.242

A coleta do material será feita pelo método de raspagem da lesão (escarificação), o material coletado será fixado em papel filtro para posterior análise molecular. A identificação molecular será feita pela técnica de Reação em Cadeia da

Polimerase (PCR), O produto da PCR, será então sequenciado para identificação das espécies. Os pacientes serão agrupados de acordo com a espécie de Leishmania encontrada, e seus aspectos clínicos e epidemiológicos poderão ser descritos com base nos resultados encontrados. Espera-se poder mapear a ocorrência de casos de LC por cepas de pouca circulação na região, além de obter dados relativos à evolução clínica desses casos e com isso uma avaliação de prognóstico em relação as cepas de alta circulação na região.

HIPOTESE

As espécies de leishmania tidas como baixa circulação em pacientes do estado do Amazonas estão surgindo com uma maior frequência, com aspectos clínicos diferentes das espécies mais frequentes.

METODOLOGIA

TIPO DE ESTUDO: Estudo prospectivo, descritivo, de casos de leishmaniose cutânea atendidos no ambulatório da Fundação de Medicina Tropical Dr.Heitor Vieira Dourado. Local de realização do estudo: O estudo será realizado no ambulatório e no laboratório de leishmaniose na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), em Manaus, Amazonas. População do estudo: Serão incluídos pacientes com leishmaniose

cutânea confirmada através de exame laboratorial de raspado da borda da lesão (escarificado – exame direto) atendidos no ambulatório de leishmaniose da FMT-HVD, selecionados após concordarem em participar do estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que serão agrupados de acordo com a espécie de Leishmania encontrada, e seus aspectos clínicos e epidemiológicos poderão serão descritos com base no prontuário de atendimento e ficha clinica preenchida durante o atendimento.

Coleta do Material e extração de DNA total/PCR por Mini Exon: A coleta do material será feita pelo método de raspado de borda da lesão,(escarificação) realizada pelo responsável do projeto,durante a coleta do exame direto, sendo o material fixado em papel de filtro (Unifini®) em dois pontos diferentes, alocado em saco zip lock e armazenado em freezer a -20°C para posterior processamento.

O papel filtro contendo as amostras serão eluidas em solução salina tamponada (PBS) para

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM **Município:** MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

7.6 Equipe de trabalho

| Nome | Formação | Instituição | Função |
|-----------------------------------|--------------|--------------------|----------------|
| Denison Vital de Jesus | Biomédico | UEA/FMT-HVD | Mestrando |
| Jorge Augusto de Oliveira Guerra | Médico | FMT-HVD | Orientador |
| Maria das Graças Vales Barbosa | Bióloga | UEA/FMT-HVD | Co-orientadora |
| Felipe Jules de Araújo Santos | Biólogo | FUHAM | Co-orientador |
| Luciana Mendes dos Santos | Médica | UEA/FMT-HVD | Colaboradora |
| Melissa de Souza Melo Cavalcante | Médica | UEA/FMT-HVD | Colaboradora |
| Silmara Navarro Pennini | Médica | FUHAM/ FMAT-HVD | Colaboradora |
| Arineia Soares da Silva | Bióloga | UEA/FMT-HVD | Colaboradora |
| André Luiz Leturiondo | Farmacêutico | FUHAM | Colaborador |
| Cynthia de Oliveira Ferreira | Farmacêutica | FUHAM | Colaboradora |
| Cintia Mara Costa Oliveira | Bióloga | FUHAM | Colaboradora |
| Marcia Viviana Gonçalves Vallejos | Biomédica | FMT-HVD | Colaboradora |

8. ANEXOS

8.1 Termo de anuência Fundação Alfredo da Matta – FUAM



TERMO DE ANUÊNCIA

O Departamento de Ensino e Pesquisa da Fundação Alfredo da Matta - FUAM, declara estar ciente e de acordo com a parceria com o grupo de pesquisa em Doença de Chagas e Leishmaniose Dr. João Macias Frade, da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – FMTHVD, com objetivo principal de troca de experiências entre os grupos, visando estabelecer protocolos para diagnóstico molecular de qPCR *in house* da Leishmaniose Tegumentar Americana no Amazonas. A parceria irá envolver a utilização do espaço e equipamentos do Laboratório de Biologia molecular.

Manaus, 17 de maio de 2021.

Valderiza Lourenço Pedrosa

Dra. Valderiza Lourenço Pedrosa
Departamento de Ensino e Pesquisa



FUNDAÇÃO DE DERMATOLOGIA
TROPICAL E VENEREOLOGIA
ALFREDO DA MATTA - FUAM

Rua Codajás, 24 – Cachoeirinha.
Fone: (92) 3632-5800
Fax: (92) 3632-5802
Manaus - AM CEP 69065-130



CENTRO COLABORADOR
OMS/OPAS.



8.2 Procedimento operacional padrão (POP) – Coleta de material escarificado em papel filtro

| | | | |
|---|---|---|---|
|  |  | <p>FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525</p> |  <p><small>Grupo de Pesquisa em Zoonose de Oropetia Dr. João Ricardo Farias Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal do Rio de Janeiro</small></p> |
| <p>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP (Novo código)</p> <p>TÍTULO: Coleta de material escarificado em papel filtro</p> | | | |
| <p>Elaborado por: Denison Vital de Jesus</p> | <p>Revisado e aprovado por:</p> | <p>Data de aplicação</p> | |
| | | <p>Data da próxima revisão</p> | |

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento de coleta de material escarificado em papel filtro de lesões de pacientes com LTA.

2. DEFINIÇÕES

“Imprint” de lesão: compreende em pressionar o papel de filtro no local escarificado para armazenamento do material.

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

O procedimento se aplica à pesquisa e diagnóstico laboratorial de rotina.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade, responsável pela unidade e pessoal técnico.

5. POP’S RELACIONADOS

6. EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO NECESSÁRIOS

6.1 Luva de látex descartável

6.3 Máscara descartável

6.4 Avental manga longa descartável

7. RECUROS NECESSÁRIOS

7.1 Materiais

7.1.1 Algodão embebido em álcool a 70%

7.1.2 Lanceta estéril descartável (Aço inoxidável 5,5 cm)

7.1.3 Compressa de gaze estéril (7,5 x 7,5 cm)

7.1.4 Papel de filtro para armazenamento de material biológico

7.1.5 Esparadrapo impermeável (10,0 x 4,5 cm)

7.1.6 Papel toalha

7.1.7 Caixa de descarte de material perfurocortante

7.2 Reagentes e soluções

7.3.1 Soro fisiológico 0,9%

7.3.2 Álcool 70%

7.3.3 Sulfato de Neomicina 5 mg

8. PROCEDIMENTOS

8.1 Procedimento de coleta em papel filtro

8.1.1 Realizar a limpeza da lesão com solução fisiológica utilizando gaze estéril, caso o paciente tenha mais de uma lesão, selecionar duas lesões mais recentes;

8.1.2 Com auxílio de lanceta estéril escarificar pelo menos três diferentes áreas da borda da lesão, de preferência área eritematosa da superfície íntegra que a circunda;

8.1.3 Pressionar, no local escarificado, papel d filtro previamente identificado. Realizar vários "Imprints".

8.1.4 Após o procedimento aplicar Sulfato de Neomicina nas lesões escarificadas e cobrir com gaze estéril e prender com esparadrapo.

8.2 Procedimento Armazenamento

Após a coleta acondicionar o papel de filtro em envelope de plástico com lacre e armazenar em freezer.

9. ANEXOS

Não se aplica

8.3 Procedimento operacional padrão (POP) – Extração de ácidos nucleicos.

| | | | |
|---|---|------------------|---------------------|
|  | GOVERNO DO AMAZONAS SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE FUNDAÇÃO HOSPITALAR ALFREDO DA MATTA PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | | Página 1 de 3 |
| Código | Data de Emissão | Data de Vigência | Versão nº 01 |
| ÁREA EMITENTE: Biologia Molecular | | | |
| TÍTULO: Extração de Ácidos Nucléicos a partir de biópsia de lesão | | | |

INFORMAÇÕES GERAIS

Técnica inicial para obtenção de DNA genômico, uma vez que é etapa importante para iniciar todos os outros experimentos da área da Biologia Molecular. De modo geral, a partir da amostra clínica de interesse, como a biópsia, ocorre a lise da célula e em seguida é realizado a purificação do DNA, separando o DNA dos restos celulares.

MATERIAIS NECESSÁRIOS

1. Kit com os reagentes e descartáveis para extração de DNA (Qiagen ou outro fornecedor).
2. Pipetas monocanaís com volumes de 100ul, 200ul e 1000ul.
3. Ponteiras para volumes de 20ul, 100ul, 200ul e 1000ul, todas com filtro.
4. Microtubos com volume de 1,5ml.
5. Álcool Absoluto.
6. Recipiente para descarte de material contaminado.
7. Capela de fluxo laminar com UV
8. Banho seco
9. Microcentrifuga.
10. Vortex.
11. Luvas descartáveis.
12. Jaleco descartável
13. Gorro.

14. Etiqueta de identificação.

DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO

1. Ligar UV da capela de fluxo laminar por 15 minutos antes de iniciar o procedimento.
2. Paramenta-se com todos os EPIs necessários e previamente citados.
3. Verificar quantidade e concentração dos reagentes do kit: Proteinase K, tampão ATL, tampão AL, tampão AE, tampão AW1, tampão AW2.
4. Verificar descartáveis do kit de acordo com a quantidade de amostra a ser extraída: Coluna MiniSpin e tubo coletor.
5. Separar os microtubos de 1,5ml devidamente identificados e com amostras de biópsia previamente clivada (POP – recebimento e processamento de amostra de biópsia).
6. Adicionar junto ao microtubo tampão ATL 180µl.
7. Adicionar proteinase K 20µl.
8. Vortexar por 1 a 3 segundos.
9. Incubar 56°C em banho seco por 2 a 5 horas vortexando 30 em 30 minutos.
10. Seguir para a próxima etapa, após o tempo decorrido, verificar se houve total lise do tecido.
11. Adicionar tampão AL 200µl e vortexar 15 segundos.
12. Adicionar 200µl de álcool absoluto e vortexar 15 segundos.
13. Passar o conteúdo para a Coluna MiniSpin, e centrifugar ao 8000RPM por 1 minuto.
14. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna em um novo tubo, então adicionar 500µl de tampão AW1.
15. Centrifugar por 1 minuto a 8000 RPM.
16. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna em um novo tubo coletor e adicionar 500µl de tampão AW2.
17. Centrifugar 3 minutos a 14000 RPM.
18. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna MiniSpin em um novo microtubo (ependorf) de 1,5ml limpo e já identificado, pipetar 100µl de tampão AE diretamente no centro da coluna.
19. Incubar em temperatura ambiente por 2 minutos depois centrifugar à 8000 RPM para eluir.
20. Armazenar o DNA extraído a -20°C.

CUIDADOS ESPECIAIS

1. Deixar UV ligada por 15 minutos antes de iniciar e após finalizar.
2. Cuidado com a identificação dos tubos durante a transferência das amostras e reagentes para novos tubos;
3. Descartar em local devido o material contaminado.
4. Armazenamento dos kits em temperatura adequada e de acordo com as exigências do fabricante.
5. Limpeza do local antes e após uso.

RESULTADOS ESPERADOS

Aproximadamente 1/6 do punch de 4 mm de biópsia de tecido humano rende, aproximadamente, 6 µg de DNA (30 ng/ µl) em 100 µl de buffer AE, com uma razão A260/A280 de 1,7 – 1,9.

AÇÕES EM CASO DE NÃO CONFORMIDADE

Condições das amostras – podem interferir na realização do procedimento, solicita-se nova coleta.

Validade e estabilidade dos reagentes utilizados – manter em local adequado, em caso de vencimento ou finalização de um dos reagentes, abrir caixa nova.

Esterilização do ambiente de trabalho – limpeza deficiente pode levar a contaminação da amostra, sempre limpar o local antes de iniciar e após finalização.

Identificação incorreta de amostras – atenção para não haver troca de amostras, se for percebido erro, solicitar nova coleta.

REFERÊNCIAS

DNeasy Blood & Tissue Handbook - <https://www.qiagen.com/cn/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit/>

8.4 Procedimento operacional padrão (POP) – PCR convencional

| | | | |
|---|---|------------------|---------------------|
|  | GOVERNO DO AMAZONAS SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE FUNDAÇÃO HOSPITALAR ALFREDO DA MATTA PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | | Página 1 de 3 |
| Código | Data de Emissão | Data de Vigência | Versão nº 01 |
| ÁREA EMITENTE: Biologia Molecular | | | |
| TÍTULO: Reação em cadeia da polimerase - PCR | | | |

INFORMAÇÕES GERAIS

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica que consiste na amplificação de sequências específicas de ácidos nucleicos. Realizada utilizando o DNA previamente extraído (ver POP extração de DNA - Biópsia), iniciadores específicos dos agentes de interesse, além de bases nucleotídicas sintéticas (dNTPs), Taq DNA polimerase e o termociclador.

Aplicação na rotina para diagnóstico de Leishmaniose e amplificação dos genes relacionados a resistência medicamentosa no tratamento de hanseníase (genes *folp1*, *RpoB* e *Gyra*).

MATERIAIS NECESSÁRIOS

Material Permanente:

1. Termociclador de PCR modelo Veriti ou Proflex (Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific)
2. Micropipetas monocal e multicanal automáticas de volume variável.
3. Cabine tipo *Workstation* com luz ultravioleta (UV);
4. Vortex.
5. Centrífuga de microtubos

Materiais de consumo:

1. 2. Ponteiras de 10 a 100µL estéril e com barreira, para evitar contaminação.
2. Microtubos de 1,5 ml
3. Microtubos de 0,2 ml
4. Álcool 70%.
5. Lenço de papel sem pelo.
6. Recipiente com gelo para manter reagentes e amostras.
7. Água ultrapura ou água de injeção.

8. Master mix.
9. 11. Iniciadores ou *primers* em concentrações de uso.
10. 14. Pincel 0.5mm, tinta permanente.
11. 15. Recipiente para descarte de material.
12. 16. EPIs: luvas sem talco, jaleco, máscara, gorro e propés descartáveis.

INSTRUÇÕES E VERIFICAÇÃO DE MATERIAIS NECESSÁRIOS:

1. Certifique-se de que os reagentes estão nas concentrações corretas e volumes suficientes.
2. Calcular o volume da reação a ser preparada.
3. Separar as amostras que serão utilizadas.
4. Montar uma mata de identificação dos testes e imprimir (Sala II).
5. Ligar o Termociclador Veriti ou Proflex.
6. Limpar as cabines *Workstation* e as micropipetas com álcool 70% (Sala I e II);
7. Forrar a bancada com papel manilha e fita adesiva.
8. Ligar a luz ultravioleta e aguardar 15 minutos.
9. Verificar se todo material necessário está disponível.
10. Paramentar-se com os EPIs descartáveis.
11. Colocar o microtubos de 0,2ml e de 1,5ml na capela sobre o suporte para tubos.
12. Identificar os tubos com numeração de identificação o nome do gene de interesse.

Descrição dos procedimentos da técnica (Sala I):

1. Preparar o mix da reação com os volumes e concentrações previamente calculados (*sempre iniciar pela água*), *homogeneizando com a pipeta cuidadosamente para evitar a formação de bolhas*.
2. Distribuir o mix nos microtubos de 0,2ml.
3. Remover o lixo gerado e descartá-lo.
4. Limpar as pipetas e a capela com álcool 70%.
5. Ligar a UV por 15 minutos.
6. Levar a placa para a sala de procedimentos-II.

Descrição dos procedimentos da técnica (Sala II):

1. Colocar os microtubos de 0,2ml contendo o mix na cabine *Workstation*.
2. Homogeneizar ligeiramente as amostras em vórtex e para evitar a formação de aerossóis e centrifugar no modo "spin" por poucos segundos.
3. Colocar as amostras sobre a bancada e iniciar a transferência para os microtubos referente a sua numeração de identificação. *Pipetar cuidadosamente a fim de minimizar os riscos de contaminação entre amostras na reação*.
4. Trocar a ponteira a cada pipetagem de amostra, descartando em recipiente próprio.
5. Levar os microtubos para o termociclador Veriti ou Proflex na sala III.

Descrição dos procedimentos da técnica (Sala III):

1. Abrir tampa do termociclador Veriti ou Proflex.
2. Insira os microtubos.
3. Feche a porta do equipamento e inicie a corrida (previamente salva);
4. Após o fim da corrida deve ser realizada a etapa de eletroforese (ver POP - Eletroforese).

CUIDADOS ESPECIAIS

Higiene e Conservação de Materiais e Ambiente

1. Certificar-se de que as bancadas e pisos estão limpos;
2. Certificar-se de que os equipamentos estão funcionando;
3. Certificar-se de que a lixeira está com saco plástico de 1º uso;
4. Ao iniciar e no término das atividades realizar a desinfecção das bancadas com solução de hipoclorito de sódio a 2% ou álcool à 70% e forrar bancada com papel adequado;
5. Abastecer a bancada de trabalho com os materiais necessários para as atividades.

RESULTADOS ESPERADOS

Presença ou ausência de amplificação de gene alvo, porém sua visualização é apenas possível após realização a etapa de eletroforese.

AÇÕES EM CASO DE NÃO CONFORMIDADE

Diante de qualquer não conformidade, anotá-la e comunicá-la ao Responsável Técnico e/ou à Subgerente, Gerente de Laboratórios.

Em caso de erro ou dúvida se as amostras estão trocadas, necessário realizar procedimento desde o início.

REFERÊNCIAS

<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr.html>

<https://www.thermofisher.com/br/en/home/technical-resources/technical-reference-library/pcr-cdna-synthesis-support-center.html>

8.5 Procedimento operacinal padrão (POP) – Eletroforese

| | | | |
|---|---|------------------|---------------------|
|  | GOVERNO DO AMAZONAS SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE FUNDAÇÃO HOSPITALAR ALFREDO DA MATTA PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | | Página 1 de 3 |
| Código | Data de Emissão | Data de Vigência | Versão nº 01 |
| ÁREA EMITENTE: Biologia Molecular | | | |
| TÍTULO: Eletroforese em gel de agarose | | | |

INFORMAÇÕES GERAIS

A eletroforese é o método usado para separar moléculas de DNA de acordo com o seu tamanho e carga elétrica, seu resultado é visualizado com a submissão em Luz UV, que utilizando um corante de alta sensibilidade quando está junto a molécula de DNA emite uma fluorescência.

MATERIAIS NECESSÁRIOS

1. Touca
2. Mascara
3. Jaleco
4. Luva
5. Espátula
6. Balança
7. Proveta
8. Erlenmeyer
9. Microondas
10. Pipeta
11. Ponteira
12. Funil
13. Parafilme
14. Papel alumínio.

15. Bandeja de Gel
16. Pentes
17. Cuba de eletroforese
18. Fonte para cuba de eletroforese
19. Transiluminador UV
20. Agarose
21. Blue Juice
22. Ladder
23. Tae
24. Caneta
25. Papel
26. Tesoura
27. Mapa de amostra
28. Câmera de aparelho celular.

DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO

1. Verificar quantas amostras serão utilizadas e quantos poços serão necessários para colocá-las. (Incluindo Kb Plus, Branco e Controle positivo).
2. Paramenta-se com todos os EPIs necessários e previamente citados.
3. Ligar a balança, desligar o ar-condicionado para não alterar a pesagem, tarar com o suporte de pesagem e pesar agarose a 1% com 0,1g para cada 10ml de tampão TAE 1X.
4. Medir a quantidade, em uma proveta, de tampão TAE 1X necessária para colocar no suporte da placa de agarose:
Pequena: 20ml
Média: 40ml
Grande: 80ml
5. Colocar a agarose e o tampão TAE 1X medidos no Erlenmeyer lavando o suporte da placa de agarose com tampão TAE 1X para não perder o material pesado.
6. Levar ao microondas para dissolver observando de 15 em 15 segundos, retirando, homogeneizando e verificando até a dissolução completa.
7. Adicionar 1uL de SYBER para cada 10ml de tampão TAE 1X.
8. Esfriar o Erlenmeyer em água corrente e despejar este conteúdo no suporte da placa de agarose e aguardar a formação do gel, fechando com papel alumínio para não haver contato com a luz.
9. Na cuba de eletroforese, despejar tampão “usado”, em seguida colocar o suporte da placa de agarose de forma que fique coberto com este tampão.
10. Distribuir 1 à 2 uL de *Blue Juice* em papel parafilme para cada amostra que será utilizada.
11. Na cuba de eletroforese, pipetar:

12. No 1° poço: Kb Plus-Ladder - 1 à 2 uL;
13. No 2° poço: Branco com *Blue Juice* - 1 à 2 uL;
14. No 3° poço em diante: Amostra composta com *Blue Juice* - 1 à 5 uL;
15. Por fim, colocar o Controle Positivo (C+) com *Blue Juice* - 1 à 5 uL.
16. Ligar a fonte de eletroforese, verificar se os fios estão bem conectados e a posição (preto à esquerda e vermelho à direita).
17. Ajustar a voltagem na tecla SET com 65W, 70mA por 30min, em seguida clicar no botão RUN para iniciar. Aguardar o tempo esperado e iniciar uma nova corrida ajustando para 80W, 70mA por 15min, aguardar.
18. Ligar na tomada o aparelho transiluminador UV Safe Imager (Invitrogen).
19. Colocar o gel da corrida no aparelho transiluminador UV Safe Imager (Invitrogen).
20. Desligar a luz da sala e ligar a luz UV do aparelho transiluminador UV Safe Imager (Invitrogen) e capturar a foto com seu aparelho celular, em seguida desligar a luz UV.
21. Analisar as bandas que se formaram no gel.
22. Enviar imagem do gel para e-mail pessoal, e salvar a imagem na Pasta Gel (localizada dentro do repositório do laboratório no computador).
23. Renomear as bandas ou poços na imagem do gel utilizando o software Word.
24. Imprimir imagem e colar no caderno ATA do laboratório.

AÇÕES EM CASO DE NÃO CONFORMIDADE

Em casos de dúvida em relação ao resultado ou não amplificação dos genes da resistência, repete-se o processo a partir da reação de PCR convencional (ver Pop PCR convencional).

REFERENCIAS

<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/dna-rna-purification/analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-electrophoresis.html>

8.6 Procedimento operacional padrão (POP) – Purificação de produto da PCR

| | | | |
|---|---|------------------|---------------------|
|  | GOVERNO DO AMAZONAS SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE FUNDAÇÃO HOSPITALAR ALFREDO DA MATTA PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | | Página 1 de 3 |
| Código | Data de Emissão | Data de Vigência | Versão nº 01 |
| ÁREA EMITENTE: Biologia Molecular | | | |
| TÍTULO: Purificação de produto da PCR | | | |

INFORMAÇÕES GERAIS

Técnica realizada para purificar o produto resultante da PCR convencional, para que o produto da purificação seja utilizado como amostras para o sequenciamento. Considerando que a qualidade da amostra é essencial para a obtenção de uma sequência de alta qualidade.

MATERIAIS NECESSÁRIOS

1. Touca
2. Mascara
3. Luva
4. Jaleco
5. Pipeta
6. Ponteira
7. Pincel
8. Tubos
9. Colunas (tubo de spin)
10. Centrífuga
11. Kit com seus reagentes descartáveis: GFX PCR DNA and gel band purification
12. Elution buffer type 6
13. Elution buffer type 4
14. Capture buffer type3
15. Wash buffer type 1
16. Recipiente para descarte

DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO

1. Paramenta-se com todos os EPIs necessários e previamente citados;
2. Em um tubo eppendorf, colocar 10 µl de produto de PCR mais 500 µl do capture buffer 3.
3. Vortex, em seguida efetuar um SPIN e transferir para coluna.
4. Centrifugar: Selecionar Xg e colocar 1600 por 30 seg.
5. Descartar o líquido e lavar com tampão Wash buffer Type 1 com 500 µl.
6. Centrifugar novamente Xg 16000 por 30 seg.
7. Descartar o líquido e eluir.
8. Bandas Fortes: 50 µl de eluiton e buffer type 6 Bandas Fracas: 20 µl de eluiton e buffer type 6 Usar a Centrífuga no modo Xg 16000 por 60 seg.

CUIDADOS ESPECIAIS

1. Higienização da bancada
2. Uso de EPIS's
3. Armazenar o kit em ambiente 15 à 25C° e em lugar seco

AÇÕES EM CASO DE NÃO CONFORMIDADE

Em caso de não conformidade se repete o procedimento de purificação.

8.7 Procedimento operacional padrão (POP) – Sequenciamento de DNA

| | | | |
|---|---|------------------|---------------------|
|  | GOVERNO DO AMAZONAS SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE FUNDAÇÃO HOSPITALAR ALFREDO DA MATTA PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | | Página 1 de 3 |
| Código | Data de Emissão | Data de Vigência | Versão nº 01 |
| ÁREA EMITENTE: Biologia Molecular | | | |
| TÍTULO: Sequenciamento de DNA – método de Sanger | | | |

INFORMAÇÕES GERAIS

O sequenciamento de DNA tem por finalidade determinar a ordem das bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina e timina) em uma fita nucleotídicas.

O sequenciamento resulta numa representação linear simbólica conhecida como sequência, a qual sucintamente resume a estrutura da molécula sequenciada.

INSTRUÇÕES IMPORTANTES ANTES DE REALIZAR A REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

1. Realizar a seleção das amostras que serão sequenciadas;
2. Estas deverão estar purificadas e quantificadas;
3. A concentração ótima para uma reação de sequenciamento é de 10ng
4. As amostras (produto da PCR) devem estar armazenadas em Freezer a -20°C e deve-se evitar o congelamento/descongelamento frequentemente de uma mesma amostra;
5. Verificar se dispõe de todo o material necessário para o desenvolvimento deste procedimento, antes de iniciá-lo;
6. Utilizar Equipamentos de Proteção Individual (E.P.I.): bata de manga longa, luvas, máscara e óculos de proteção ou protetor facial, quando necessário;
7. Observar as Normas de Biossegurança;
8. Diante de qualquer não conformidade, anotá-la e comunicá-la ao Responsável Técnico e/ou à Sub-Gerente, Gerente de Laboratórios.

MATERIAIS NECESSÁRIOS PARA A REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Cuidados especiais (Sala I e II):

1. Limpar as capelas e bancadas com Álcool 70%, forrar com papel manilha a bancada de trabalho;
2. Colocar dentro capela: as racks de ponteiras, microtubos de 0.5mL, pincel micropipetas automáticas, suporte e placa de sequenciamento, tudo previamente limpos com álcool 70%;
3. Ligar a lâmpada ultravioleta (UV) das capelas por 15 minutos antes de iniciar os procedimentos da reação.

Preparo da reação de sequenciamento (sala de procedimento I - sala de PCR)

1. Antes de iniciar o preparo da reação, certifique-se que os reagentes do kit BigDay, iniciadores e água estejam completamente descongelados.
2. Prepare o Mix da reação em microtubo adequado ao volume calculado (0,5uL ou 1,5uL), envolto em papel alumínio. *O cálculo do volume de Mix dependerá da quantidade de amostras que serão sequenciadas. Abaixo, segue o protocolo com cálculo para uma amostra.*
3. Distribuir o volume de mix adequado nos poços da placa de sequenciamento obedecendo a ordem em coluna (mapa da placa acima), *mantenha a placa coberta com papel alumínio;*
4. Vedar a placa com adesivo ou tiras de tampas (Cap Strips) e retirar da capela;
5. Limpar com Álcool 70% a capela e todo material usado. Guardar os materiais em seus respectivos locais. Retirar também o material descartado. Ligar a UV por mais 15 minutos para total desinfecção da capela;
6. Levar a placa para a sala de procedimentos II onde será adicionado o DNA;
7. Colocar o produto da PCR devidamente quantificado nas respectivas posições/ poços, de acordo com o mapa da placa;
8. Selar a placa com adesivo ou tiras de tampas (Cap Strips);
9. Em seguida, centrifugar a placa por 1 minuto em temperatura ambiente (30°C) à 4.000 RPM;

10. Colocar a placa em termociclador com a seguinte ciclagem padrão de sequenciamento;

| temperatura | tempo | ciclos |
|-------------|----------------------|-----------|
| 96°C | 1 minuto | 15 ciclos |
| 96°C | 10 segundos | |
| 50°C | 15 segundos | |
| 60°C | 1 minuto 30 segundos | |
| 96°C | 10 segundos | 5 ciclos |
| 50°C | 15 segundos | |
| 60°C | 2 minutos | |
| 4°C | infinito | |

Preparo do Mix para reação de sequenciamento:

| Mix* | Tampão* | Oligoiniciador* | BigDye* v3.1 | H2O* | DN A | Volume de Mix/poço | Volume final/reação |
|--------|---------|-----------------|--------------|--------|------|--------------------|---------------------|
| 1,0 uL | 2,0 uL | 1,0 uL | 0,3 uL | 4,7 uL | 1 uL | 9 uL | 10 uL |

12. Após finalização da termociclagem, identificar na lateral da placa: NOME DO RESPONSÁVEL TÉCNICO PELA PLACA, DATA DO ENVIO, LOCAL DE ONDE ESTÁ SENDO ENVIADO (no caso FUAM) e enviar para Fiocruz-Manaus onde será feito a purificação da reação e a leitura no sequenciador.

OBS 1: A placa deve ser transportada lacrada com adesivo ou tiras de tampas (Cap Strips), envolta de papel alumínio, acondicionada em caixa de isopor com gelo. Enviar junto o mapa da respectiva placa impresso, identificado com o nome do responsável técnico, data e local de onde está sendo enviado.

OBS 2: Preferencialmente, a placa não deve ser enviada na sexta-feira.

OBS 3: Antes de iniciar o procedimento da reação é necessário o cadastro da solicitação de sequenciamento no site da plataforma de genômica da Fiocruz, o PDTIS: <http://plataformas.cdts.fiocruz.br/site>, que deve ser realizado pelos responsáveis pelo laboratório (André, Cynthia e Camila).

CUIDADOS ESPECIAIS

Realizar os procedimentos em duas salas distintas, com boa iluminação, refrigeradas, contendo bancada para apoio. Uma sala necessariamente com capela que forneça luz UV.

HIGIENE E CONSERVAÇÃO DE MATERIAIS E AMBIENTE

1. Certificar-se de que as bancadas e pisos estão limpos;
2. Certificar-se de que os equipamentos estão funcionando;
3. Certificar-se de que a lixeira está com saco plástico de 1º uso;
4. Ao iniciar e no término das atividades realizar a desinfecção das bancadas com solução de hipoclorito de sódio a 2% ou álcool à 70% e forrar bancada com papel adequado;
5. Abastecer a bancada de trabalho com os materiais necessários para as atividades.

RESULTADOS ESPERADOS

Obter uma reação de sequenciamento com os nucleotídeos incorporados para identificação do alvo desejado.

AÇÕES EM CASO DE NÃO CONFORMIDADE

Em caso de não conformidade, chamar o Responsável Técnico do Laboratório e/ou a Sub-Gerente, Gerente de Laboratórios.

REFERÊNCIAS

https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F4404319_3500_3500xL_SeqStdBigDyeTerm_PI.pdf

https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F4337035_BDTv31CycSqKt_RUO_UG.pdf