

Ricardo Andrade Zampieri

Discriminação de organismos do gênero *Leishmania* por análises de perfis de
dissociação em alta resolução (HRM – *High Resolution Melting*)

Versão Corrigida

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical
de São Paulo da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde
Internacional
Orientadora: Profa. Dra. Lucile Maria Floeter-Winter

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de
São Paulo da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Zampieri, Ricardo Andrade

Discriminação de organismos do gênero *Leishmania* por análises de perfis de dissociação em alta resolução (HRM – High Resolution Melting) / Ricardo Andrade Zampieri. – São Paulo, 2019.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

OrientadorA: Lucile Maria Floeter-Winter.

Descritores: 1. DOENÇAS NEGLIGENCIADAS. 2. DIAGNÓSTICO. 3. DNA. 4. REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE.

USP/IMTSP/BIB-06/2019.

Aos meus meninos Raphael e Cassiano, por serem meu mais perfeito experimento.

À Thais, pelo amor e cumplicidade em tudo.

AGRADECIMENTOS

À Dra Lucile Maria Floeter-Winter, pelos ensinamentos, pela confiança, pelo incentivo e por todo auxílio empregado na minha formação. Um agradecimento à parte a essa orientação que começou bem antes dos meus projetos de pós-graduação e que se estendem além deles. Obrigado! Que venham mais anos de convívio!

À Dra Sandra Márcia Muxel, pela parceria, ensinamentos, incentivo e amizade dentro e fora do lab. Obrigado por compartilhar suas oportunidades e por dividir comigo a complexa tarefa de gerenciar o BatLab (merecemos um retrato de funcionários do mês doze vezes por ano!).

À Dra Juliana Ide Aoki, pelo harmonioso convívio, pelos ensinamentos, vivência e amizade dentro e fora do lab. Obrigado por compartilhar suas oportunidades e pelos momentos sempre tão divertidos na bancada ou no café.

À Dra Maria Fernanda Laranjeira da Silva, que mesmo distante fisicamente durante boa parte desse processo, esteve sempre presente. Obrigado pelos ensinamentos e pela amizade de tão longa data.

Ao amigo Karl Erik Müller, parceiro de doutoramento, pelos ensinamentos, pelo incisivo incentivo, confiança e parceria. Obrigado por compartilhar conhecimento e oportunidades e por viabilizar o curto, mas fantástico estágio em Bergen. Vamos que vamos! Jeg ser frem til videre samarbeid!

Ao professor Audun Helge Nerland, pela parceria nas discussões científicas e pela habitual prontidão em ajudar. Obrigado pelos ensinamentos e pela oportunidade e recepção na Universidade de Bergen.

Aos amigos BatLabianos Stephanie Maia Acuña, Juliane Cristina Fernandes Ribeiro, Carolina Lima Jorge, Ana Carolina Stocco e Rubia Heloisa Vanderlinde, pela convivência, troca de conhecimento e experiência e momentos de descontração.

Ao professor Dr. Jeffrey Jon Shaw, por compartilhar toda sua fantástica experiência com o mundo das leishmânias, por seus ensinamentos, conselhos e incentivo.

Aos membros da banca examinadora de qualificação Dra. Maria Carolina Q. B. E. Sabbaga, Dr. José Eduardo Tolezano e Dr. José Ângelo L. Lindoso, pela disponibilidade e tão relevantes contribuições para o desenvolvimento dessa tese.

Ao Dr. José Ângelo L. Lindoso e à MSc. Ana Paula da Silva por confiarem na proposta desse projeto, disponibilizando amostras preciosas que serviram para o aperfeiçoamento da técnica e da minha capacidade analítica.

À Dra. Thaís Helena Proença de Freitas e Dr. John Veasey, por confiarem na proposta do projeto, disponibilizando amostras preciosas que resultaram na “cereja do bolo” deste trabalho. Obrigado por me darem a percepção da realidade clínica das leishmanioses do lado de fora de um laboratório de pesquisa.

À equipe do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, em especial à Eliane Araújo, sempre acessível e eficiente no auxílio para o cumprimento das formalidades e trâmites da pós-graduação, pela atenção, dedicação e comprometimento profissional, além das agradáveis conversas; e ao Carlos José Quinteiro, pela prontidão em ajudar e pela preciosa gentileza com a qual ajudou na confecção e formatação dessa tese.

À Roseli Silva Santos, pela amizade e cumplicidade nesses vários anos de trabalho no IB-USP e pelas valiosas dicas sobre os trâmites da pós-graduação.

Aos meus pais Conceição e Tadeu, pela minha vida e criação baseada na honestidade e amor; Obrigado, Renata, Fábio, Lucas, Giovana, Ana Maria, Enilson, Luana, Lorena e Patricia, por compartilharem suas vidas nessa linda, grande e barulhenta família. Todos vocês participaram de alguma forma deste processo que, como sabem, significa muito para mim.

À MSc., supermãe e PhD. em companheirismo Thais Massanet, por compartilhar comigo essa vida tão louca e fantástica! Obrigado por me apoiar e cuidar de mim. Tamo junto!

Aos meus pequenos grandes homens Raphael e Cassiano, por existirem e por me fazerem tão feliz e orgulhoso. O sucesso de vocês agora é meu objetivo principal.

Às agências que direta ou indiretamente financiaram esse projeto de pesquisa: FAPESP, CNPq, CAPES.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse projeto científico e pessoal e que por falha minha não estão listados nessas páginas.

“O progresso da Ciência depende de novas técnicas, novas descobertas e novas ideias, talvez nessa ordem.”

Sydney Brenner

RESUMO

Zampieri RA. Discriminação de organismos do gênero *Leishmania* por análises de perfis de dissociação em alta resolução (HRM – *High Resolution Melting*) (tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

Leishmanioses são doenças classificadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como negligenciadas, o que as caracteriza como aquelas que prevalecem em condições de pobreza e representam significativo entrave ao desenvolvimento por contribuírem para desigualdade. Cerca de 350 milhões de pessoas vivem sob o risco de infecção em 98 países da África, Eurásia e Américas. Acometem o homem e outros animais sob um espectro clínico amplo, que varia de discretas lesões, de cura espontânea, a quadros de comprometimento sistêmico, potencialmente fatais. A manutenção do ciclo de transmissão está inserida em um sistema biológico complexo, com a participação de mais de 20 espécies de *Leishmania* e uma grande variedade de reservatórios e vetores, e o diagnóstico está entre as estratégias empregadas para o controle dessas doenças. A precisa identificação das espécies envolvidas no ciclo de transmissão permite a geração de dados importantes para mapeamentos ecoepidemiológicos e para o delineamento de estratégias terapêuticas e de controle. O material genético do parasita como alvo de detecção e identificação desses organismos é descrito na literatura científica em trabalhos que abordam diversas estratégias metodológicas. Entre as técnicas mais recentes estão as análises de dissociação em alta resolução (HRM- *High Resolution Melting*), descrita como uma estratégia eficiente para a discriminação de polimorfismos em fragmentos específicos de DNA gerados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). O presente trabalho teve como principal objetivo padronizar um protocolo de detecção e identificação de *Leishmania* capaz de discriminar o maior número possível de espécies com base em polimorfismos do gene *hsp70*, utilizando HRM como ferramenta metodológica. Sequências nucleotídicas de *hsp70* disponíveis em banco de dados e obtidas no laboratório foram analisadas *in silico* e regiões polimórficas foram delimitadas. Das regiões delimitadas, três foram escolhidas por conterem polimorfismos que geraram fragmentos cujas temperaturas de dissociação simuladas são distintas entre espécies ou grupo de espécies. A exploração de perfis de dissociação dos três amplicons de *hsp70* obtidos por PCR em tempo real revelou diferenças que permitiram a discriminação das espécies de *Leishmania* responsáveis por doenças nas Américas, África e Eurásia. Os testes foram padronizados com a utilização de DNA de cepas-referência de *Leishmania* e então aplicados a amostras de DNA obtidas de amostras clínicas, de campo ou experimentais, como isolados, biópsias humanas frescas ou fixadas, flebotomíneos e cães naturalmente infectados e camundongos experimentalmente infectados. Os resultados obtidos por HRM foram comparados aos obtidos previamente por outras metodologias como PCR convencional, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ou sequenciamento, com confirmação da identidade do parasita nas amostras testadas. O protocolo descrito é relativamente barato, tecnicamente simples, passível de automatização, podendo ser uma alternativa para a detecção e identificação de *Leishmania* em amostras, em estudos diagnósticos e ecoepidemiológicos.

Descritores: Doenças negligenciadas. Diagnóstico. DNA. Reação em cadeia por polimerase.

ABSTRACT

Zampieri RA. Discrimination of organisms from the *Leishmania* genus by High Resolution Melting analysis (HRM) (thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

According to the World Health Organization (WHO), the leishmaniases are classified as neglected diseases, since they are related to poverty and contribute to inequality. Approximately 350 million people are at risk of infection in 98 countries in Africa, Eurasia and Americas. They affect humans and other animals that, depending on the species, causes a wide spectrum of clinical manifestations, that range from discrete lesions of spontaneous healing to potentially fatal systemic disease. The maintenance of the transmission cycle is part of a complex biological system, in which there is the participation of more than 20 species of *Leishmania* and a large variety of reservoirs and vectors. Diagnosis is important for early control of the disease. A precise identification of the species involved in the transmission cycle allows the generation of important data for eco-epidemiological mapping and for therapeutic measures and control strategies. Several genes have been used as diagnostic targets and several molecular strategies have been used in diagnosis. High resolution melting (HRM) analysis is among the most recent techniques and it is described as an efficient strategy for discriminating polymorphisms in specific DNA fragments generated by PCR (Polymerase Chain Reaction). The main objective of this work was to standardize a protocol for detection and identification of *Leishmania spp*, capable of discriminating the largest possible number of species based on *hsp70* gene polymorphisms through HRM methodological tool. Available nucleotide sequences of *hsp70* in databases as well as the ones obtained in the laboratory were analyzed *in silico* and polymorphic regions were delimited. Three regions were chosen since they contained polymorphisms that generated distinct simulated dissociation temperatures among species or group of species. The analysis of dissociation profiles of the three amplicons of *hsp70* obtained by real-time PCR revealed differences that allowed the discrimination of *Leishmania* species responsible for diseases in the Americas, Africa and Eurasia. The tests were standardized using DNA from *Leishmania* reference strains and then applied to DNA samples obtained from clinical or from field samples, such as isolates, fresh or fixed human biopsies, phlebotomines and dogs naturally infected, and experimentally infected mice. The results obtained by HRM were compared to those obtained previously by other methodologies such as conventional PCR, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) or sequencing, confirming the parasite identity in the samples tested. The described protocol is relatively inexpensive, technically simple, potentially automated, and may be an alternative for the detection and identification of *Leishmania* in biological samples, in diagnostic and eco-epidemiological studies.

Descriptors: Neglected diseases. Diagnosis. DNA. Polymerase chain reaction.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Os organismos do gênero <i>Leishmania</i>	13
1.2	As leishmanioses.....	14
1.3	O diagnóstico das leishmanioses.....	18
1.4	O DNA como alvo de detecção e identificação de <i>Leishmania</i>	20
1.5	O gene <i>hsp70</i> como alvo de detecção e identificação de <i>Leishmania</i>	23
1.6	Perfis de dissociação em alta resolução - (HRM – <i>High Resolution Melting</i>).....	25
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	Objetivo geral.....	30
2.2	Objetivos específicos.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	Análises <i>in silico</i> de sequências nucleotídicas.....	32
3.2	Amostras.....	32
3.2.1	Cepas de tripanossomatídeos.....	32
3.2.2	Amostras de banco de DNA genômico.....	33
3.2.2.1	Amostras de DNA de cepas de <i>Leishmania</i> previamente caracterizadas.....	33
3.2.2.2	Amostras de DNA de origem humana.....	34
3.2.2.3	Amostras de DNA obtidas de animais experimentalmente infectados.....	35
3.2.2.4	Amostras de DNA obtidas de flebotomíneos.....	35
3.3	Protocolos de extração de DNA.....	35
3.3.1	Extração de DNA de culturas axênicas de tripanossomatídeos.....	35
3.3.2	Extração de DNA de biópsias e tecidos frescos.....	36
3.3.3	Extração de DNA de biópsias parafinadas.....	36
3.3.4	Extração de DNA de flebotomíneos.....	37
3.3.5	Extração de DNA de plasmídeo.....	37
3.4	Reações de polimerização em cadeia (PCR).....	38
3.4.1	Oligonucleotídeos.....	38
3.4.2	PCR convencional.....	38
3.4.3	PCR em tempo real.....	39
3.5	Clonagem e sequenciamento de fragmentos de DNA.....	40
3.5.1	Ligação de fragmentos de DNA em vetor de clonagem.....	40
3.5.2	Preparo de bactérias competentes e transformação bacteriana.....	40
3.5.3	Determinação de sequências nucleotídicas dos fragmentos de DNA..	41
3.6	Ensaio de dissociação em alta resolução (HRM).....	41
3.7	Análises de padrões gerados por enzimas de restrição (RFLP).....	41
3.8	Análises estatísticas.....	42
3.9	Considerações éticas.....	42
4	RESULTADOS.....	43
4.1	Análises <i>in silico</i> de sítios polimórficos no gene <i>hsp70</i> com potencial para a identificação de espécies de <i>Leishmania</i>	44
4.2	Especificidade e sensibilidade dos ensaios de HRM.....	58
4.3	Pré-amplificação de alvo.....	70
4.4	Simulação de infecções mistas.....	75
4.5	Comparação de experimentos realizados em equipamentos diferentes.....	77
4.6	Validação dos protocolos de identificação por HRM com cepas previamente caracterizadas.....	78

4.7	Identificação de <i>Leishmania</i> em amostras clínicas e de campo, previamente testadas com outros alvos, obtidas do banco de DNA do Laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos.....	80
4.8	Identificação de <i>Leishmania</i> em amostras clínicas em estudo retrospectivo com amostras parafinadas de pacientes com suspeita de leishmaniose da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.....	82
4.9	Determinação de perfis de dissociação de isolados de <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) spp. previamente caracterizados como híbridos.....	85
5	DISCUSSÃO.....	89
6	CONCLUSÕES.....	108
	REFERÊNCIAS.....	112
	ANEXO A.....	125

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os organismos do gênero *Leishmania*

Os organismos do gênero *Leishmania*, descritos pela primeira vez em 1903 por Ross¹, são protozoários flagelados dispostos taxonomicamente, segundo a classificação revisada por Espinosa *et al.*², da seguinte forma: Filo Euglenozoa; Classe Kinetoplastea; Subclasse Metakinetoplastina; Ordem Trypanosomatida; Família Trypanosomatidae; Subfamília Leishmaniinae; Gênero *Leishmania*; Subgêneros *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)*, *L. (Mundinia)* e *L. (Sauroleishmania)*.

Esses organismos são parasitas obrigatórios e desenvolvem ciclo de vida heteroxênico, infectando hospedeiros vertebrados e invertebrados. Apresentam-se no ciclo de vida sob dois principais estágios morfológicos: a forma amastigota, que parasita o interior de células de defesa do hospedeiro vertebrado e a forma promastigota, que se desenvolve no tubo digestório do hospedeiro invertebrado³. Aderidas às células do trato digestório do hospedeiro invertebrado (insetos hematófagos da subfamília Phlebotominae), as formas predominantes são as promastigotas. Esse estágio apresenta intensa atividade de multiplicação por fissão binária e são denominadas procíclicas. Ao atingir uma alta densidade populacional, que coincide com a escassez de nutrientes, promastigotas procíclicas interrompem a multiplicação e soltam-se do epitélio intestinal, iniciando a migração para a probóscide do inseto e a diferenciação para formas infectivas, denominadas promastigotas metacíclicas. Na ocasião de um novo repasto sanguíneo, as formas promastigotas metacíclicas são inoculadas no tegumento do hospedeiro vertebrado onde os parasitas são fagocitados por células de defesa do hospedeiro mamífero, principalmente macrófagos. No interior dos macrófagos, os parasitas têm como habitat o interior dos fagolisossomos, estruturas formadas pela fusão do vacúolo parasitóforo com lisossomos. Nesse ambiente se diferenciam em formas

amastigotas, que se multiplicam por fissão binária até a lise da célula hospedeira, quando são fagocitadas por novos macrófagos, aumentando as dimensões da infecção. Os macrófagos infectados, ingeridos por um flebotômíneo no repasto sanguíneo, carregam os parasitas que, ao serem liberados, diferenciam-se em formas promastigotas e colonizam o trato digestório do inseto, fechando assim o ciclo natural do parasita³.

Compõem o gênero *Leishmania* mais de quarenta espécies descritas, distribuídas em quatro subgêneros classificados de acordo com estudos filogenéticos, com a biologia do parasita e seu comportamento no hospedeiro^{2, 4}. As espécies que parasitam mamíferos estão inseridas em três subgêneros: *L. (Leishmania)*, que compreende espécies amplamente distribuídas em cinco continentes, e que se desenvolvem na porção anterior do tubo digestório do inseto vetor, provocam extensas lesões nos hospedeiros vertebrados e crescem de forma relativamente rápida em condições laboratoriais⁴; *L. (Viannia)*, que agrupa espécies geograficamente restritas a países do continente americano, e se desenvolvem na porção posterior do tubo digestório do inseto vetor, com desenvolvimento relativamente lento tanto em meios de cultura como em lesões que acometem o hospedeiro vertebrado⁴; e *L. (Mundinia)*, que foi recentemente descrito para agrupar algumas espécies que divergem filogeneticamente dos outros subgêneros, como *L. (M.) enriettii*, *L. (M.) martiniquensis* e alguns isolados ainda não muito bem caracterizados até o momento². O subgênero *L. (Sauroleishmania)* agrupa parasitas que têm como hospedeiro vertebrado espécies de lagartos, com distribuição restrita a alguns países da Europa, Ásia e África⁵.

1.2 As leishmanioses

Leishmanioses são as doenças, genericamente nomeadas, cujos agentes causadores são os organismos do gênero *Leishmania*. São classificadas pela

Organização Mundial da Saúde (OMS) como negligenciadas, o que as caracterizam como aquelas que além de prevalecerem em condições de pobreza, representam significativo entrave ao desenvolvimento dos países afetados por contribuírem para a manutenção da desigualdade⁶. A OMS categoriza as leishmanioses como uma das doenças negligenciadas tropicais sobre as quais o desenvolvimento de novos tratamentos deve ser prioridade⁷. Segundo dados da OMS, as leishmanioses são endêmicas em 98 países da África, Eurásia e das Américas, e cerca de 350 milhões de pessoas vivem em área de risco de infecção^{8, 9}. São doenças não contagiosas primariamente consideradas zoonoses, mas são categorizadas como antropozoonoses quando o homem entra em contato com o parasita no seu ciclo silvestre de transmissão¹⁰. Mais de vinte espécies da subfamília Leishmaniinae são descritas como os agentes etiológicos da doença², e podem acometer seus hospedeiros produzindo um amplo espectro de diferentes manifestações clínicas que dependem do *background* genético do hospedeiro e da espécie do parasita envolvido na infecção¹¹.

Sob um ponto de vista ecológico, as leishmanioses são caracterizadas como doenças em que o meio ambiente exerce um importante papel dentro da tríade epidemiológica: agente–meio ambiente–hospedeiro¹². Fatores ambientais como geografia física, fauna flebotomínica e espécies de reservatórios vertebrados presentes em determinada área devem ser levados em conta no estudo ecoepidemiológico da doença. O aparecimento da enfermidade no homem é relacionado com seu contato com o ambiente silvestre, onde o ciclo do parasita está naturalmente instalado. Em situações de adensamento populacional junto a áreas de florestas, desflorestamento ou qualquer outro fator que altere o equilíbrio ambiental, observa-se a adaptação de vetores e reservatórios a ambientes peridomiciliares ou domiciliares, com a inclusão acidental do homem no ciclo¹².

As diferentes espécies de *Leishmania* causam distintos quadros clínicos que podem variar desde lesões cutâneas de cura espontânea a comprometimentos sistêmicos mais graves e potencialmente fatais. Genericamente essas manifestações clínicas são classificadas em dois principais grupos, denominados leishmaniose visceral e leishmanioses tegumentares.

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, tem como principais sinais clínicos febre persistente, hipertrofia do baço e anemia⁷. É potencialmente mais grave quando comparada às formas tegumentares, acometendo o sistema linfo-monocitário, muitas vezes com evolução fatal, quando não tratada de forma adequada, o que ocorre em cerca de 10% dos casos¹³. Em pacientes imunodeprimidos, como os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), a leishmaniose visceral pode gerar quadros clínicos atípicos, como o acometimento do trato gastrointestinal, peritônio, pulmões e pele, com prejuízos ao tratamento com antirretrovirais⁹. Na África e na Ásia essa forma da doença é causada por *L. (L.) donovani*. No Oriente Médio, Mediterrâneo, Ásia Central e Américas do Sul e Central, causada por *L. (L.) infantum*⁷, sendo que nas Américas a nomenclatura empregada para essa espécie é *L. (L.) infantum chagasi*, resultado de uma ampla discussão travada por especialistas nas últimas décadas^{14, 15}. Segundo alguns autores, *L. (L.) chagasi* é sinônima de *L. (L.) infantum* e foi inserida em ciclos de infecção no continente americano durante a colonização espanhola e portuguesa^{16, 17}, enquanto outros argumentam a favor da existência da espécie no continente anteriormente à colonização¹⁸. A nomenclatura mais amplamente aceita emprega *L. (L.) infantum chagasi* como nome do agente etiológico da leishmaniose visceral nas Américas, com base em argumentos que sugerem que, apesar da possibilidade da origem recente ser a mesma, resultados de processos evolutivos justificam a utilização de nomenclatura específica¹⁴. O Brasil está entre os sete países que registram mais de 90% de casos de leishmaniose visceral no mundo e entre os 12

países afetados nas Américas, com participação em 96% dos 3354 novos casos registrados no ano de 2016 na América Latina^{7, 19}.

As leishmanioses tegumentares são doenças não contagiosas de evolução crônica que acometem de forma localizada ou difusa estruturas da pele e nasofaringe. Essas formas são consideradas clinicamente menos graves, visto que seus efeitos são geralmente delimitados a mucosas e/ou pele, mas podem resultar em quadros graves e desfigurantes, com destruição de palato e septo nasal, por exemplo²⁰. Pacientes coinfectados com HIV apresentam lesões múltiplas, polimórficas e reincidentes⁹. A OMS tem como estimativa uma incidência de 700 mil a 1 milhão de novos casos no mundo, com Brasil, Peru, Afeganistão, Paquistão, Síria, Arábia Saudita, Argélia e Irã registrando cerca de 90% dos casos^{7, 21}. No ano de 2016, segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS), foram registrados no Brasil 12690 casos de leishmaniose tegumentar, com 94% desses casos relacionados à forma cutânea e 6% à forma mucosa.

No Mediterrâneo, África, Oriente Médio e Índia, as leishmanioses tegumentares são causadas por *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica*, enquanto nas Américas do Sul e Central as espécies *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* são as responsáveis pelo maior número de casos humanos⁷. No Brasil as espécies envolvidas nas infecções que determinam as manifestações tegumentares são principalmente *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, seguidas das espécies *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) linderbergi*, com menor incidência⁹. Apesar de relatos da presença de *L. (L.) mexicana* em território brasileiro, a atribuição de infecções por essa espécie na América do Sul deve ser feita com cuidado²². Há também no Brasil registro da presença de *L. (V.) utinguensis*, mas sem registros de infecções humanas^{9, 23}.

1.3 O diagnóstico das leishmanioses

A manutenção do ciclo de transmissão das leishmanioses está inserida em um sistema biológico complexo que envolve características biológicas do parasita, hospedeiros e vetores e o diagnóstico está entre as estratégias empregadas para o controle dessas doenças. Além disso, a precisa identificação das espécies envolvidas nos ciclos de transmissão permite a geração de dados importantes para mapeamentos ecoepidemiológicos e, em tese, para o delineamento de estratégias e protocolos terapêuticos mais eficientes.

O diagnóstico clínico dessas doenças é baseado essencialmente em critérios fisiopatológicos e em aspectos particulares das manifestações clínicas, como tipo e localização das lesões por elas causadas. A leishmaniose visceral, por exemplo, teria indicativo no diagnóstico clínico todo indivíduo com febre e esplenomegalia proveniente de área com registros de transmissão da doença. As leishmanioses tegumentares são clinicamente diagnosticadas com base na observação de suas manifestações clássicas, as formas cutânea ou mucosa^{24, 25}.

O diagnóstico laboratorial das leishmanioses pode ser realizado de forma direta, com a demonstração da presença do parasita em amostras biológicas, ou seja, com a busca direta do agente por microscopia, por cultivo do parasita em meios de cultura apropriados, ou pela detecção de biomoléculas do parasita, como proteínas ou ácidos nucleicos; ou de forma indireta, com a detecção de anticorpos produzidos pelo hospedeiro contra o parasita.

Entre as metodologias clássicas empregadas na identificação de *Leishmania* estão as análises de perfis eletroforéticos de isoenzimas e as reações de detecção de antígenos do parasita com anticorpos monoclonais^{17, 26, 27}. Esses métodos se baseiam na expressão fenotípica das diferentes espécies, e por combinarem dados de uma grande variedade de alvos, dezenas às vezes, geram perfis altamente informativos a respeito da identidade dos organismos testados. Esses ensaios têm

contribuído largamente para a taxonomia do gênero, porém, por dependerem basicamente do estabelecimento de cultura de parasitas e parte dos alvos testados estarem presentes apenas nas formas promastigotas, não são totalmente compatíveis com a realidade das amostras biológicas mais comuns no diagnóstico de rotina.

O diagnóstico clássico da leishmaniose visceral é realizado por microscopia ótica quando há observação de formas amastigotas, principalmente em amostras de medula óssea, baço, aspirados de linfonodos ou sangue periférico, com sensibilidade que varia entre os tipos de tecido analisados⁹. Vários testes sorológicos são empregados para confirmação do diagnóstico de leishmaniose visceral, incluindo metodologias como ELISA, imunofluorescência indireta, *western blotting* e testes de aglutinação direta. A detecção de anticorpos utilizando essas metodologias são bastante sensíveis nas fases agudas da doença, porém muitas vezes são complexos no que se refere à execução e interpretação de resultados. Dois desses testes, o teste rápido imunocromatográfico baseado no antígeno rk39 e o teste de aglutinação direta foram desenvolvidos para aplicação em campo e têm apresentado boa acurácia diagnóstica, porém, como outros testes sorológicos, não distinguem infecções atuais de infecções passadas^{7, 9}.

Testes baseados na detecção de material genético do parasita, erroneamente chamados de testes moleculares uma vez que testes que detectam proteínas do parasita também poderiam ser enquadrados nessa categoria, têm sido propostos como uma ferramenta bastante sensível na detecção de parasitas em pacientes com leishmaniose visceral. Reações de polimerização em cadeia (PCR) baseadas em diversos genes alvo têm sido descritas com sensibilidades que variam com o tipo de material biológico analisado, a região geográfica e a espécie de parasita envolvida²⁸.

A identificação da espécie responsável pela infecção, especialmente nos casos das leishmanioses tegumentares, pode ser bastante útil no planejamento das condutas clínicas, particularmente em regiões onde mais de uma espécie do parasita coexistem. O amplo espectro sob o qual essa forma se apresenta acentua a necessidade de um diagnóstico diferencial, uma vez que as suas características clínicas podem ser confundidas com as de outras doenças, muitas vezes endêmicas na mesma região, como infecções por estafilococos, estreptococos, micobactérias, fungos, hanseníase, sarcoidose e câncer. Porém, atualmente, nenhum teste é utilizado como padrão-ouro no diagnóstico das leishmanioses tegumentares e a observação direta de formas amastigotas em esfregaços ou biópsias ainda é o que estabelece o diagnóstico^{7, 30}. Além de testes diretos de microscopia, a rotina diagnóstica das leishmanioses tegumentares emprega análises histopatológicas das lesões, testes sorológicos e o teste intradérmico com antígenos do parasita, denominado reação de Montenegro. No entanto, esses métodos, apesar de indicarem a confirmação da patologia, não identificam a espécie do parasita envolvido na infecção. O emprego de técnicas que detectam alvos específicos no DNA nuclear ou mitocondrial tem permitido a detecção, quantificação e, dependendo do alvo, a identificação de espécies relacionadas às formas tegumentares. Seu emprego, combinado aos métodos parasitológicos clássicos, é uma ferramenta que tem sido descrita no diagnóstico da doença⁷.

1.4 O DNA como alvo de detecção e identificação de *Leishmania*

Levando em conta que todos os seres vivos têm uma origem comum, e que, portanto, são relacionados entre si, podemos inferir que parte da informação genética contida nos genomas é comum entre vários grupos de organismos. Contudo, outra fração do genoma compõe um perfil específico obtido por processos evolutivos, característicos dos diferentes grupos de organismos. De maneira geral, as regiões

do DNA empregadas como alvos na detecção e identificação de organismos são altamente conservadas entre as diferentes espécies, por terem importante função biológica e, por isso, estarem sob uma alta pressão de seleção, mas, por outro lado, devem conter polimorfismos específicos, que permitem a discriminação de diferentes grupos. A teoria proposta por Tibayrenc e Ayala³¹, de que protozoários parasitas se reproduzem essencialmente de forma clonal (o que não implica a ausência de recombinações genéticas), assume que as características genéticas individualizadas entre esses organismos seriam extremamente aparentadas, o que as tornam uma ferramenta potencialmente útil de identificação específica.

A disponibilidade cada vez maior de dados em bancos especializados que acumulam informações sobre biomoléculas específicas, como sequências de genes, transcritos, proteínas preditas, ou mesmo informações completas de organismos, como genomas, transcriptomas, proteomas e metabolomas, torna a busca por alvos específicos cada vez mais trivial e permite a escolha de uma grande variedade de alvos para a identificação específica de diferentes patógenos.

Protocolos de identificação de *Leishmania* spp. por diferentes métodos, que exploram características específicas do DNA, foram descritos nas últimas décadas. Inicialmente alguns protocolos foram baseados em análises de padrões gerados por enzimas de restrição (RFLP - *Restriction Fragments Length Polymorphisms*) em fragmentos de DNA de *Leishmania* e de outros tripanossomatídeos³²⁻³⁴. Outro tipo de abordagem foram as genotipagens por hibridação molecular com sondas de DNA construídas para reconhecer polimorfismos genéticos nos parasitas. Essa técnica foi utilizada tanto em estudos discriminatórios entre espécies fortemente relacionadas como no diagnóstico de infecções^{35, 36}. A amplificação de fragmentos com iniciadores aleatórios (RAPD - *Randomly Amplified Polymorphic DNA*) foi também uma estratégia adotada para analisar padrões específicos capazes de discriminar espécies de *Leishmania*^{37, 38}. Em função de inúmeras vantagens, os testes baseados

em reações de polimerização em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) são as principais ferramentas utilizadas na detecção e identificação de alvos de DNA. Essa metodologia permite, além da utilização de quantidades ínfimas de analito, a discriminação específica de organismos pela exploração de polimorfismos dos alvos. Diferentes protocolos baseados em PCR têm sido empregados na identificação de *Leishmania* por apresentarem vantagens como altas sensibilidade e especificidade e relativa rapidez quando comparados às técnicas clássicas baseadas em microscopia e cultura de células²⁵.

Esses protocolos têm sido desenvolvidos com base em polimorfismos no DNA do parasita presentes em diferentes regiões do genoma mitocondrial (DNA de cinetoplasto ou kDNA)^{39, 40}, ou genes nucleares, como os que codificam a subunidade menor do ribossomo (SSUrDNA)^{35, 36, 41-49}, glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)^{44, 46, 49-51}, proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70)⁵²⁻⁵⁶, aminoácido permease 3 (AAP3)⁵⁷, cisteína proteinase B (CPB)^{58, 59}, ou regiões intergênicas (ITSs)⁶⁰⁻⁶², entre outros. A identificação do parasita baseada nesses protocolos é alcançada em diferentes níveis taxonômicos e são muitas vezes dependentes da associação de alvos e/ou metodologias, como a exploração de diferentes regiões do genoma, digestões de produtos de PCR com enzimas de restrição, sequenciamento direto dos produtos de PCR ou análises de fracionamentos eletroforéticos.

A evolução da técnica de PCR com o advento da PCR em tempo real, entre outras variantes, disponibilizou uma ferramenta valiosa para a detecção, quantificação e tipagem de alvos de DNA, com vantagens sobre a técnica convencional como potencial de automatização, rapidez e alta sensibilidade. O emprego da PCR em tempo real no diagnóstico de leishmanioses tem sido descrito na literatura, com cada vez mais frequência nos últimos anos, em trabalhos que

abordam a exploração de diversos alvos para a detecção, quantificação e identificação de espécies de *Leishmania*⁶³.

1.5 O gene *hsp70* como alvo de detecção e identificação de *Leishmania*

As proteínas de choque térmico (HSPs – *heat shock proteins*) foram inicialmente descritas como produtos gênicos cuja expressão é induzida por calor e foram tradicionalmente classificadas de acordo com seu tamanho molecular. Essas proteínas estão entre as mais conservadas entre os diversos grupos de organismos e estão funcionalmente relacionadas com a secreção, dobramento, endereçamento celular, regulação e degradação de outras proteínas⁶⁴.

A proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70 – 70 kDa *heat shock protein*) é uma chaperona molecular envolvida na homeostase de *Leishmania* durante os diferentes tipos de estresse aos quais o parasita é submetido durante seu ciclo de vida, como as variações drásticas de temperatura e pH e reações frente ao estresse oxidativo no interior das células de defesa do hospedeiro vertebrado⁶⁵.

Na literatura são descritas duas classes de genes que codificam HSP70 (*hsp70-I* e *hsp70-II*) em *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. As duas classes do gene têm em comum tanto a região codificante da proteína HSP70 (ORF- *Open Reading Frame*, ou fase aberta de leitura) quanto a região que a flanqueia à montante, 5'UTR (5' *Untranslated Region*, ou região não traduzida à montante), enquanto a região que flanqueia a ORF à jusante, 3'UTR (3' *Untranslated Region*, ou região não traduzida à jusante), é a porção que as diferenciam. De uma maneira geral, uma série em *tandem* de cópias de *hsp70-I* é seguida de uma cópia de *hsp70-II*⁶⁶⁻⁶⁸. Foi demonstrado que em *L. (L.) infantum* há acúmulo de mRNA de *hsp70-I* como resposta ao choque térmico, porém com tradução independente de temperatura (26 ou 37°C), enquanto que *hsp70-II* não

é acumulada como resposta a uma variação de temperatura, mas é preferencialmente expressa a 37°C⁶⁷.

Essa proteína está codificada no genoma de *Leishmania* em um número variável de cópias do gene, dependendo da espécie do parasita⁶⁵. No cromossomo 30 de *L. (L.) major* foram encontradas 5 cópias do gene, 4 delas dispostas em *tandem* e uma quinta cópia localizada em outro *locus*⁶⁴. Em *L. (L.) amazonensis*, também no mesmo cromossomo, foram mapeadas 7 cópias organizadas em *tandem* e uma cópia extra localizada em outro *locus*^{68, 69}. No cromossomo 28 de *L. (V.) braziliensis* foram mapeadas 6 cópias em *tandem* e uma cópia extra localizada em um *locus* distinto⁷⁰.

As sequências nucleotídicas que codificam essa proteína têm sido utilizadas como alvo de estudos filogenéticos em diversos grupos de organismos e têm balizado parâmetros para o posicionamento taxonômico de *Leishmania*⁶⁶. O principal motivo que colocou esse alvo em evidência foi o fato de que muitos dos protocolos que exploram as sequências do gene geram resultados quase completamente compatíveis com os obtidos pelos testes de perfis de isoenzimas, que estão entre os mais informativos no que se refere a estratégias de identificação de *Leishmania*^{17, 27}. Em seguida do primeiro trabalho que explorou polimorfismos no gene *hsp70* para a identificação de *Leishmania*, realizado por Garcia *et al.*⁵⁵ com o emprego de PCR-RFLP, outros grupos mostraram a possibilidade de discriminar esses organismos associando diferentes enzimas de restrição à essa técnica^{52-54, 71, 72} ou ainda associando a determinação de polimorfismos por sequenciamento direto de regiões do gene⁷³. Comparado à maioria dos outros, o *hsp70* está entre os alvos com maior poder discriminatório em nível de espécie em *Leishmania*, e quase nenhuma variação intraespecífica é observada nos ensaios de RFLP atualmente utilizados⁷⁴. Algumas evidências, porém, mostram que variações intraespecíficas podem ser detectadas com a utilização dessa metodologia. Perfis eletroforéticos distintos obtidos por RFLP foram produzidos por cepas diferentes de *L. (L.) amazonensis* e *L.*

(*V. naiffi*), como resultado da presença de alelos polimórficos em diferentes cepas da mesma espécie. Evidências como essas apontam para a necessidade de cautela no emprego desses protocolos no diagnóstico de casos clínicos de leishmaniose e identificação de espécies de *Leishmania* do Brasil⁷⁵.

1.6 Perfis de dissociação em alta resolução - (HRM – *High Resolution Melting*)

A conformação de um segmento de DNA é dependente, entre outros fatores, da temperatura. Essa variável pode ser empregada de forma controlada para gerar um perfil da dinâmica de transição do DNA de dupla-fita para simples-fita e diferenças na composição nucleotídica de fragmentos de mesmo tamanho podem ser detectadas por produzirem perfis de dissociação distintos. Características da composição nucleotídica do DNA, como o conteúdo de GC (%GC) e índices de complexidade do DNA foram classicamente determinadas pelo monitoramento da absorvância de UV em gradientes de temperatura, com a utilização de massas na ordem de microgramas da molécula para a obtenção de curvas de dissociação em estudos que, entre outros focos, procuraram estimar a complexidade de genomas ou a similaridade entre genomas de espécies aparentadas. Experimentos dessa natureza, conhecidos como ensaios de cinética de reassociação de DNA ou RNA, baseados na determinação de proporções entre DNA dissociado/reassociado (ou desnaturado/renaturado), por gradientes de temperatura, colunas de afinidade ou marcações radiativas, foram importantes para a caracterização inicial dos genomas nucleares e de cinetoplastos de tripanossomatídeos⁷⁶⁻⁷⁹.

A análise de perfis de dissociação em alta resolução, HRM, sigla para *High Resolution Melting*, é uma ferramenta relativamente recente que pode eficientemente ser empregada na identificação de variações em sequências de DNA. Essa técnica foi introduzida nas rotinas laboratoriais em meados dos anos 2000 por colaborações

entre a Academia e a Indústria⁸⁰. Metodologicamente, a técnica consiste em registros da intensidade de fluorescência gerada pela interação entre DNA dupla-fita e corantes fluorescentes saturantes obtidos em intervalos constantes de variação em um gradiente de temperatura. É uma abordagem análoga à utilizada na determinação de curvas de dissociação por monitoramento de absorbância. O DNA dupla-fita gerado em uma PCR, em temperaturas relativamente baixas, é corado com um intercalante fluorescente de DNA, produzindo uma intensidade de fluorescência proporcional à quantidade de moléculas intercaladas presente na amostra. À medida que essa amostra é submetida a um aumento gradual de temperatura, a ligação do corante se dá em função inversa da desnaturação da dupla fita de DNA, com consequente e progressivo decaimento da fluorescência. A dinâmica desse sistema é influenciada por vários fatores, alguns totalmente inerentes à natureza físico-química do DNA, como %GC e tamanho da molécula⁸¹ e outros relacionados ao meio onde se encontra o DNA no momento da análise, como força iônica ou a presença de substâncias desnaturantes como o DMSO^{82, 83}.

A evolução da técnica de HRM se deu com o desenvolvimento de reagentes, instrumentos de alta precisão e *softwares* de análise específicos. O desenvolvimento de novos reagentes, como os agentes intercalantes de DNA saturantes, permitiu o aumento da sensibilidade e da precisão na detecção de moléculas variantes de DNA. Os agentes intercalantes saturantes podem ser adicionados às reações de amplificação em altas concentrações sem prejudicar a performance das DNA polimerases, aumentando a fluorescência gerada na sua ligação a moléculas dupla-fita de DNA, com baixa afinidade às moléculas simples-fita⁸⁰. Nos processos de desnaturação do DNA, os agentes intercalantes não saturantes redistribuem-se ao longo das porções ainda associadas, produzindo uma fluorescência que não é totalmente proporcional à quantidade de ligações entre as duas fitas. A dinâmica de ligação agente saturante-DNA se dá de forma que o corante não é redistribuído nas

porções ainda associadas de DNA, pois as ligações entre as fitas estão saturadas de corante e, logo, a fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de ligações entre as fitas, o que pode ser utilizado como um parâmetro bastante preciso para a discriminação de moléculas com discretas variações em sua composição⁸⁴. Corantes comercialmente conhecidos como EvaGreen (Biotium) LCGreen (Idaho Technology) e SYTO 9 (Invitrogen) são alguns dos agentes intercalantes saturantes mais utilizados nos protocolos de HRM.

Tão importante quanto o desenvolvimento de corantes foi a evolução dos termocicladores. As plataformas desenhadas para testes de HRM são equipamentos que, além de permitirem que a PCR seja realizada, coletam dados de fluorescência com resolução mais refinada do que os instrumentos convencionais. Assim, incrementos sucessivos de temperatura podem ter redução de 0,5°C (intervalo alcançado pela maioria dos equipamentos convencionais), para 0,008 a 0,2°C. Paralelamente, *softwares* específicos, que utilizam algoritmos para interpretação de dados e removem ruídos inerentes à técnica, têm sido desenvolvidos para aumentar a precisão das análises⁸⁰.

Entre as principais vantagens da técnica HRM está a análise dos resultados, que é feita sem a necessidade de manipulação dos produtos de PCR, como fracionamento em gel de agarose, digestão com enzimas de restrição ou reações de sequenciamento de nucleotídeos, o que minimiza potenciais contaminações do ambiente de trabalho com amplicons e reduz o tempo de obtenção de resultados. A potencial automação de todo o processo tornaria dispensável a execução e análise dos ensaios por um profissional altamente treinado, uma vez que o próprio *software* pode ser programado para emitir resultados, baseado em informações de amostras-padrão inseridas no processo.

Na área médica, onde a identificação de patógenos é um ponto chave para o tratamento de diversas doenças, a técnica de HRM pode ser aplicada geralmente

com resultados em três níveis: a identificação de espécies, a tipagem de cepas e a genotipagem de alelos. Essas informações podem ser muito úteis na caracterização de organismos resistentes a antibióticos, principalmente na rotina da microbiologia médica. A técnica, por isso, têm sido descrita nas últimas duas décadas em tentativas de se padronizar protocolos de identificação e tipagem de uma vasta lista de patógenos, que inclui vírus, bactérias e protozoários responsáveis por doenças⁸⁴.

Os primeiros artigos que descrevem a identificação de *Leishmania* por HRM datam de meados dos anos 2000. Nos últimos anos, novos trabalhos têm relatado a utilização da técnica, ainda que sejam relativamente escassos na literatura científica. A utilização de diferentes alvos, às vezes utilizados em combinações, com capacidade discriminatória variada, como identificação de espécies, grupos de espécies ou subgêneros, tem fomentado os resultados descritos em um crescente número de publicações que relatam a aplicação da técnica de HRM no diagnóstico de leishmanioses. Por serem descritos como protocolos relativamente baratos, tecnicamente simples e potencialmente automatizáveis, os ensaios de HRM se tornam uma alternativa que deve ser considerada para a detecção e identificação de *Leishmania* em amostras biológicas, em estudos diagnósticos e ecoepidemiológicos.

Com base nos pontos elencados na revisão bibliográfica apresentada nessa introdução, a hipótese que se levanta nessa tese trata da possibilidade da aplicação da técnica de HRM na discriminação específica de polimorfismos no gene *hsp70* de *Leishmania*, com enfoque objetivo na identificação do parasita e suas aplicações diagnósticas.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um protocolo prático para a identificação de organismos do gênero *Leishmania* utilizando análises de perfis de dissociação de DNA em alta resolução (HRM – *High Resolution Melting*).

2.2 Objetivos específicos

- a) Identificar alvos em sequências nucleotídicas do gene *hsp70* de *Leishmania* capazes de discriminar esses organismos em ensaios de HRM;
- b) Determinar sensibilidade e especificidade de testes de HRM em amostras de DNA de cepas-referência de *Leishmania*;
- c) Aplicar os ensaios padronizados de HRM em amostras clínicas, de campo ou de infecções experimentais e comparar os resultados com os obtidos por outros métodos que utilizam DNA como alvo de identificação;
- d) Descrever um fluxo de procedimentos para a detecção e identificação das diferentes espécies de *Leishmania* em amostras biológicas com o emprego da técnica de HRM.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análises *in silico* de sequências nucleotídicas

Sequências anotadas como referentes ao gene *hsp70* no GenBank para *L. (L.) tropica* (FN395025.1), *L. (L.) donovani* (AY702003.1), *L. (L.) infantum* (HF586350), *L. (L.) major* (FR796424.1), *L. (L.) amazonensis* (EU599090.1), *L. (L.) mexicana* (EU599091.1), *L. (L.) infantum chagasi* (FN395036.1), *L. (V.) braziliensis* (AF291716), *L. (V.) guyanensis* (EU599093.1), *L. (V.) lainsoni* (GU071174.1), *L. (V.) naiffi* (GU071183.1) e *L. (V.) shawi* (GU071177.1) foram alinhadas com sequências obtidas das cepas-referência utilizadas neste estudo para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores e determinações *in silico* de temperaturas de dissociação (T_m) dos amplicons projetados.

Os alinhamentos foram realizados com o método ClustalW Multiple Alignment⁸⁵ no software BioEdit Sequence Alignment Editor⁸⁶. As sequências de DNA alinhadas e editadas foram então submetidas a cálculos para a determinação das T_m teóricas no aplicativo *online* OligoCalc v.3.27⁸⁷.

3.2 Amostras

3.2.1 Cepas de tripanossomatídeos

Formas promastigotas das cepas-referência de *L. (L.) tropica* (MHOM/SU/60/OD), *L. (L.) donovani* (MHOM/IN/80/DD8), *L. (L.) infantum chagasi* (MCER/BR/1981/M6445), *L. (L.) major* (MHOM/IL/81/Friedlin), *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), *L. (L.) mexicana* (MNYC/BZ/62/M379), *L. (L.) lainsoni* (MHOM/BR/81/M6426), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533) and *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/84/M8408) foram cultivadas a 25°C e repicadas semanalmente

em meio M199, pH 7.4, com sais de Earle, suplementado com 10% de soro fetal bovino, bicarbonato de sódio 0,33 g/L, adenina 0,1 mM, hemina 5 mg/L, HEPES 40 mM, penicilina 10.000 U /L e estreptomicina 10.000 µg/L. Para o cultivo das cepas de *Leishmania* (*Viannia*) sp., foram adicionados 2% de urina humana ao meio.

Formas promastigotas de *L. (S.) adleri*, *L. (S.) hoogstraali*, *L. (S.) tarentolae*, coanomastigotas de *Crithidia fasciculata* (TCC-039), e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) e *T. brucei* (Lister 427), foram cultivadas a 28°C e repicadas semanalmente em meio LIT, (*Liver Infusion Tryptose*), pH 7.4, suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina 10.000 U/L e estreptomicina 10.000 µg/L.

3.2.2 Amostras de banco de DNA genômico

Para validar a aplicação da técnica de HRM em amostras clínicas ou de campo, foram selecionadas dezesseis amostras do banco de DNA genômico do Laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos (Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – IB-USP) cuja detecção e identificação de *Leishmania* já havia sido detectada por PCR convencional e/ou sequenciamento. Essas amostras são resultado de projetos ou parcerias entre o laboratório e pesquisadores de outras instituições em que a identificação de espécies de *Leishmania* é objetivo e têm fontes variadas: cepas referência e isolados de tripanossomatídeos, biópsias frescas ou fixadas, de lesões humanas ou de animais domésticos, de hospedeiros infectados natural ou experimentalmente.

3.2.2.1 Amostras de DNA de cepas de *Leishmania* previamente caracterizadas

Amostras de DNA de cepas de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/74/M2682), *L. (L.) amazonensis* (MPHI/BR/99/M12275), *L. (V.) lainsoni*

(IUBI/BR/91/M13469), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/2001/M19675), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/96/M115923), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/2001/M19869), *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/82/M6934), *L. (V.) shawi* (MHOM/BR/2001/M19670), *L. (V.) shawi* (MHOM/BR/2001/M19664) e *L. (V.) shawi* (MHOM/BR/1990/M19703) foram obtidas da coleção de DNA genômico do Laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos.

3.2.2.2 Amostras de DNA de origem humana

As amostras de origem humana obtidas de biópsias frescas foram coletadas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; ou fixadas e incluídas em blocos de parafina de pacientes do Instituto Evandro Chagas (Belém-PA). Essas amostras foram utilizadas de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) com aprovação dos respectivos Comitês de Ética em Pesquisa (CAPPesq nº 0804/07 e IEC nº 0029/2007);

Biópsias humanas parafinadas de 19 pacientes com suspeita diagnóstica de leishmaniose tegumentar que procuraram espontaneamente a Clínica de Dermatologia da Santa Casa de São Paulo, matriculados no período de 2005 a 2014, foram utilizadas nos ensaios de identificação e detecção de *Leishmania* com aprovação do Comitê de Ética do Hospital Central da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e cadastrado na Plataforma Brasil (CAAE: 48719115.0.0000.5479);

O DNA humano utilizado como padrão nos testes de especificidade e como controle negativo nos testes de detecção e identificação de *Leishmania* é parte de repositório do Instituto Oscar Freire da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, cadastrado sob o código IOF-FMUSP-2016.

3.2.2.3 Amostras de DNA obtidas de animais experimentalmente infectados

Amostras de DNA obtidas de lesões de camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* são derivadas do projeto de mestrado desenvolvido sob autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, protocolada com nº 145 de 20/10/2011;

Amostras de DNA de lesões desenvolvidas experimentalmente em hamsters infectados com isolados obtidos de pacientes humanos ou de cães são derivadas de colaboração entre o Laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos e pesquisadores da Superintendência de Controle de Endemias da Secretaria de Saúde de São Paulo (SUCEN).

3.2.2.4 Amostras de DNA obtidas de flebotomíneos

Amostras de DNA de *pools* de flebotomíneos foram obtidos de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* e *Lu. (Nyssomyia) whitmani* coletados em trabalhos de campo realizados por equipe de pesquisadores da Superintendência de Controle de Endemias da Secretaria de Saúde de São Paulo (SUCEN);

3.3 Protocolos de extração de DNA

3.3.1 Extração de DNA de culturas axênicas de tripanossomatídeos

As extrações de DNA das culturas axênicas de tripanossomatídeos foram realizadas no início da fase estacionária dos parasitas em cultura em um processo de *salting-out* de proteínas com uma adaptação do protocolo descrito por Miller *et al.*⁸⁸. Aproximadamente $2,5 \times 10^9$ promastigotas foram coletadas de 50 mL de cultura por centrifugação a $3000 \times g$ por 10 min a temperatura ambiente, ressuspensas em

6 mL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4; NaCl 400 mM; EDTA 2 mM) e lisadas com a adição de 600 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%. Após a digestão *overnight* com 1 mg de proteinase K a 37°C, 2 mL de solução saturada de NaCl foram adicionados e, após vigorosa agitação por 15 segundos, o lisado foi centrifugado por 15 min a 3000 x g a temperatura ambiente para remoção do extrato proteico precipitado. Ao sobrenadante recuperado foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto gelado e o DNA precipitado foi transferido para um microtubo contendo 1 mL de etanol a 70%, drenado e seco a temperatura ambiente. As amostras de DNA assim obtidas foram então ressuspensas em 1 mL de TE (Tris 10 mM, pH 7.4; EDTA 1 mM) e tiveram concentração e pureza determinadas por espectrofotometria no equipamento GeneQuant Pro (Amersham Biosciences, Freiburg, Baden-Württemberg, Alemanha).

3.3.2 Extração de DNA de biópsias e tecidos frescos

Fragmentos de tecidos frescos, com dimensões aproximadas de 1 a 2 mm³ imersos em tampão NET (NaCl 150 mM; EDTA 50 mM e Tris 100 mM, pH 7,4) foram drenados e processados com o *kit* DNA DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme orientações do fabricante. Resumidamente, o processo consistiu em lise dos tecidos, digestão com proteinase K e adição de etanol aos lisados, que foram posteriormente submetidos a uma centrifugação em coluna de sílica onde o DNA é retido. A coluna foi então lavada duas vezes em tampões alcoólicos e o DNA eluído em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM; pH 7.4).

3.3.3 Extração de DNA de biópsias parafinadas

Fragmentos de biópsias incuídas em blocos de parafina foram recortados com auxílio de lâmina de bisturi estéril. Seções de até 2 mm³ foram imersas em 1 mL xilol pré-aquecido a 80°C e incubadas por 5 minutos nessa temperatura, e então centrifugadas a 19200 x g a temperatura ambiente por 5 minutos. Após a drenagem do xilol sobrenadante, nova adição do solvente, centrifugação e drenagem foram

realizadas nas mesmas condições por mais duas vezes. Cada amostra passou por um passo de remoção de xilol com três imersões em 1 mL de etanol absoluto por 5 minutos a temperatura ambiente, seguidas de centrifugação e drenagem. O tecido drenado foi seco em estufa a 60°C por 10 minutos e processado com o *kit* DNA DNeasy Blood & Tissue (Qiagen), conforme as orientações do fabricante descritas na seção 3.3.2.

3.3.4 Extração de DNA de flebotomíneos

Pools de flebotomíneo imersos em tampão NET foram drenados e macerados com auxílio de pistilo estéril em solução de lise do *kit* DNA DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) e processados conforme as orientações do fabricante descritas na seção 3.3.2.

3.3.5 Extração de DNA de plasmídeo

A purificação de plasmídeos de bactérias transformantes foi realizada em mini-escala (miniprep), seguindo o protocolo descrito por Sambrook e Maniatis⁸⁹. As bactérias foram suspensas em 300 µl de solução P1 (Tris-HCl 50mM, EDTA 10 mM RNase A 100 µg/mL), lisadas pela adição de 300 µl solução de lise P2 (NaOH 0,2 N, SDS 1%) e, após adição de 300 µl solução P3 (acetato de potássio 3M, pH 5.5), os plasmídeos solúveis foram recuperados após a precipitação do DNA genômico bacteriano que foi removido por centrifugação. O DNA de plasmídeo foi então precipitado pela adição de isopropanol, lavado com etanol 70% e ressuspenso em 50 µL de tampão TE.

3.4 Reações de polimerização em cadeia (PCR)

3.4.1 Oligonucleotídeos

As sequências dos oligonucleotídeos empregados como iniciadores, os ensaios em que foram utilizados e as referências em que foram descritos estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de polimerização em cadeia

Oligonucleotídeos	Sequência 5' → 3'	Ensaio
S4 ^(a)	GATCCAGCTGCAGGTTCCACC	PCR convencional
S12 ^(a)	GGTTGATTCCGTCACGGAC	PCR convencional
S17 ^(b)	CCAAGCTGCCCAGTAGAAT	nested PCR
S18 ^(b)	TCGGGCGGATAAAACACC	nested PCR
T7 ^(c)	TAATACGACTCACTATAGGG	sequenciamento
SP6 ^(c)	ATTTAGGTGACACTATAG	sequenciamento
<i>hsp70C</i> senso ^(d)	GGACGAGATCGAGCGCATGGT	RFLP / nested PCR
<i>hsp70C</i> anti-senso ^(d)	TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG	RFLP / nested PCR
<i>hsp70F1</i> ^(e)	AGCGCATGGTGAACGATGCGTC	PCR tempo-real / HRM
<i>hsp70F2</i> ^(e)	GGAGAACTACGCGTACTCGATGAAG	PCR tempo-real / HRM
<i>hsp70F3</i>	GTCGACGCTGAACAAGGAGATCGA	PCR tempo-real / HRM
<i>hsp70R1</i> ^(e)	CTTCATCGAGTACGCGTAGTTCTCC	PCR tempo-real / HRM
<i>hsp70R2</i>	GCCGCCTCGATCTCCTTGTTTCAG	PCR tempo-real / HRM
<i>hsp70</i> -preamp-F	GGCATCCTGAACGTGTCCG	PCR pré-amplificação
<i>hsp70</i> -preamp-R	ATCTTGGTCATGATCGGGTTGCAT	PCR pré-amplificação

Sequências de oligonucleotídeos e respectivos ensaios em que foram utilizados. Referências: (a): Uliana *et al.*³⁵; (b): Savani *et al.*⁴²; (c): kit de clonagem pGEM-T Easy Vector; (d): Graça *et al.*⁵⁴; (e): Zampieri *et al.*⁹⁰.

3.4.2 PCR convencional

As reações de PCR convencionais foram realizadas com o *kit* TopTaq Master Mix (Qiagen), que contém TopTaq DNA Polimerase e dNTPs, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo e, como molde, 50 ng de DNA genômico ou 5 µL de produto de PCR diluído para as reações *nested*, no termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf). Cada reação, após uma incubação inicial de 5 min a 94°C, foi submetida a 30 ciclos que incluíam passos de desnaturação do DNA molde a 94°C por 30 s, associação

dos oligonucleotídeos ao molde por 30 s a temperaturas específicas para cada par (Tabela 2) e extensão a 72°C por 30 s. Os produtos assim gerados foram fracionados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) corado com brometo de etídeo, visualizado sob luz ultravioleta no transiluminador TFX-20M (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) e fotografado pelo fotodocumentador LAB-020 (LabTrade do Brasil).

Tabela 2 – Condições de ensaio para os pares de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR e/ou HRM

Par de oligonucleotídeos	Temperatura de associação (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
S12/S4	55	540
S17/S18	60	439
<i>hsp70C</i> senso/ <i>hsp70C</i> anti-senso	60	234
<i>hsp70F2/hsp70C</i> anti-senso	60	144
<i>hsp70F1/hsp70R1</i>	60	104
<i>hsp70F3/hsp70C</i> anti-senso	60	69
<i>hsp70-preamp-F/hsp70-preamp-R</i>	55	380

Combinação de oligonucleotídeos iniciadores com as respectivas temperaturas de associação (°C) e tamanho do amplicon em pares de bases (pb).

3.4.3 PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas com o *kit* MeltDoctor™ HRM Master Mix (Thermo Fischer Scientific), que contém AmpliTaq Gold® 360 DNA Polimerase, corante intercalante de DNA dupla-fita SYTO® 9 e dNTPs; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo e, como molde, 50 ng de DNA genômico ou 5 µL de diluições de DNA genômico ou produto de pré-amplificação. Foram utilizados os equipamentos PikoReal™ Real-Time PCR System ou StepOne System™ (Thermo Fischer Scientific). Cada reação, após uma incubação inicial de 5 min a 94°C, foi submetida a 40 ciclos que incluíam passos de desnaturação do DNA molde a 94°C por 30 s e associação dos oligonucleotídeos e extensão dos produtos a 60°C por 30 s. Os dados de fluorescência foram adquiridos ao final de cada etapa de extensão.

3.5 Clonagem e sequenciamento de fragmentos de DNA

3.5.1 Ligação de fragmentos de DNA em vetor de clonagem

Para a clonagem dos fragmentos amplificados por PCR foi utilizado o vetor de clonagem pGEM-T Easy Vector (Promega, Heidelberg, Baden-Württemberg, Alemanha), de 3015 pb, que possui o gene de resistência à ampicilina e o da β -galactosidase, origem de replicação e múltiplos sítios de clonagem.

Os produtos de PCR foram ligados ao vetor com T4 DNA ligase de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante do *kit* de clonagem pGEM-T Easy vector System I (Promega).

3.5.2 Preparo de bactérias competentes e transformação bacteriana

Bactérias *Escherichia coli* da linhagem SURE™ (Stratagene, La Jolla, Califórnia, EUA) foram cultivadas em meio de cultura SOB (triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 8,56 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM), a 37°C. Para o cultivo dessa cepa em meio semi-sólido, foi adicionado ágar ao meio SOB em concentração final de 1,5%. Seguindo o protocolo de preparo de bactérias termocompetentes descrito por Sambrook e Coulson⁸⁹, as bactérias foram tratadas com CaCl₂ e transformadas por choque térmico a 42°C.

Para a seleção de bactérias transformadas com o vetor pGEM-T Easy ligado aos amplicons de interesse, utilizou-se o antibiótico ampicilina a 100 µg/mL como agente de pressão seletiva, 30 µg/mL de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) e 70 µg/mL de X-Gal (5-bromo-4cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo) como indutor e substrato da β -galactosidase, respectivamente.

3.5.3 Determinação de sequências nucleotídicas dos fragmentos de DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado a partir de uma adaptação do protocolo de Sanger e Coulson⁹¹. As reações foram feitas com BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, Reino Unido), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante, com os oligonucleotídeos iniciadores T7 ou SP6. Os produtos das reações foram então enviados ao Serviço de Sequenciamento de DNA do Instituto de Química da USP onde foram fracionados e analisados pela Plataforma ABI 3730 DNA Analyser de 48 capilares (Life Technologies – Applied Biosystems).

3.6 Ensaios de dissociação em alta resolução (HRM)

Os ensaios de HRM foram realizados ao final de cada PCR em tempo real. Os dados que geraram os perfis de dissociação dos amplicons foram obtidos através da captura de sinais de fluorescência em intervalos de 0,2°C mantidos por 10 s da curva de dissociação ajustada no programa do termociclador (entre 60°C e 95°C). A análise dos dados de fluorescência e a construção dos perfis de dissociação foram realizadas com a utilização dos *softwares* PikoReal96 (Thermo Scientific) ou High Resolution Melt Software v3.0.1 (Life Technologies).

3.7 Análises de padrões gerados por enzimas de restrição (RFLP)

Ensaios de RFLP foram realizados para a tipagem de espécies de *Leishmania* seguindo o protocolo descrito por Graça *et al.*⁵⁴. Um fragmento de 234 pb do gene *hsp70* de *Leishmania* foi amplificado por PCR e submetidos a digestões independentes pelas enzimas de restrição *HaeIII*, *MboI* ou *BstUI*. Os produtos da clivagem foram separados em gel de agarose a 3%, e corados com brometo de etídio.

3.8 Análises estatísticas

A padronização dos ensaios de HRM com DNA de cepas-referência foi realizada com amostras testadas em duplicatas técnicas em três experimentos independentes. As diferenças estatísticas entre os valores de temperatura de dissociação, para cada amplicon, foram calculadas por análises de variância *one-way* (ANOVA One-Way) com o *software* GraphPad Prism v.7.

3.9 Considerações éticas

O presente projeto de pesquisa é cadastrado na Plataforma Brasil (CAAE: 61469916.6.1001.0068) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob registro nº 14415 em 16/11/2015 e pela Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo sob protocolo nº 297 em agosto de 2015.

Resultados

4 RESULTADOS

Como apontado na introdução dessa tese, a identificação precisa de espécies de *Leishmania* em amostras de pacientes, reservatórios e vetores, é fundamental tanto em estudos ecoepidemiológicos como no delineamento de estratégias de tratamento quimioterápico. Também como apresentado na introdução, não há atualmente um método de identificação de *Leishmania* que possa ser considerado um padrão-ouro. O mesmo se aplica aos diferentes alvos de DNA descritos e utilizados. Ainda, tendo em vista e considerando que 1) o poder informativo do gene *hsp70*, descrito em diversos trabalhos, com diferentes abordagens, o caracteriza como um alvo útil na identificação de *Leishmania* spp.; e 2) as vantagens atribuídas a técnica de HRM e seu crescente emprego em estudos em que a detecção de polimorfismos no DNA é determinante, o presente projeto foi desenvolvido inicialmente com análises *in silico*, seguidas de procedimentos experimentais, delineados e executados com o propósito de avaliar a empregabilidade da técnica e alvo na descrição de um protocolo proposto como alternativa para a identificação de parasitas e para o diagnóstico de leishmanioses.

4.1 Análises *in silico* de sítios polimórficos no gene *hsp70* com potencial para a identificação de espécies de *Leishmania*

Com o objetivo de buscar, dentro de um segmento do gene *hsp70* de *Leishmania*, sítios polimórficos capazes de discriminar as diferentes espécies, sequências disponíveis em bancos de dados e outras obtidas no laboratório foram alinhadas e analisadas. Um fragmento de 380 pb foi delimitado para balizar a escolha de sítios polimórficos em sequências disponíveis no GenBank antes dos procedimentos de desenho de oligonucleotídeos iniciadores. Esse fragmento compreende a região polimórfica que foi explorada por Graça *et al.*⁵⁴, em um trabalho publicado em 2012, para discriminar *Leishmania* spp. com a técnica de RFLP. O

alinhamento dessas sequências evidenciou identidade de 85,8% entre as espécies e foram encontrados pelo menos 54 pontos de polimorfismo distribuídos ao longo do segmento. A Figura 1 ilustra os sítios polimórficos encontrados no fragmento delimitado em um alinhamento entre as sequências de diferentes espécies de *Leishmania*.

O DNA genômico das espécies utilizadas como referência neste trabalho foi utilizado como molde em PCR convencional com iniciadores externos a todos os polimorfismos considerados e os amplicons foram clonados, sequenciados e alinhados com o objetivo de se comparar as sequências obtidas com aquelas depositadas no GenBank. O fragmento sequenciado, de 234 bp, obtido como descrito por Graça *et al.*⁵⁴, foi utilizado nessa comparação. Uma identidade de 100% foi observada entre espécies correspondentes no alinhamento das sequências obtidas no laboratório (consenso de três clones de duas reações de PCR independentes) e as disponíveis no GenBank. Os alinhamentos assim obtidos serviram como base para a delimitação de blocos de sequências com potenciais informativos distintos.

Esses blocos de sequências foram submetidos a ensaios *in silico* para determinação teórica de suas temperaturas de dissociação (T_m) e %GC. Três dos blocos de sequências analisados foram escolhidos e nomeados como Amplicon 1, Amplicon 2 e Amplicon 3, e estão representados nas Figuras 2 a 5. Os valores de T_m e %GC, calculados pelo aplicativo OligoCalc para esses fragmentos, foram dispostos graficamente para se visualizar padrões informativos capazes de discriminar as espécies submetidas ao processo e estão representadas na Figura 6 e Tabela 3. Como esperado, observamos uma correlação positiva entre valores de T_m e %GC para os três amplicons.

	1468	1478	1488	1498	1508	1518	1528	1538	1548	1558
<i>L. tro</i>	<u>GGCATCTGA</u>	<u>ACGTGTCCGC</u>	GGAGGAGAAG	GGCACC GGCA	AGCGCAACCA	GATCACCATC	ACCAACGACA	AGGGCCGGCT	GAGCAAGGAC	GAGATCGAGC
<i>L. don</i>	<u>GGCATCTGA</u>	<u>ACGTGTCCGC</u>	GGAGGAGAAG	GGCACC GGCA	AGCGTAACCA	GATCACCATC	ACCAACGACA	AGGGCCGGCT	GAGCAAGGAC	GAGATCGAGC
<i>L. inf</i>	<u>GGCATCTGA</u>	<u>ACGTGTCCGC</u>	GGAGGAGAAG	GGCACC GGCA	AGCGCAACCA	GATCACCATC	ACCAACGACA	AGGGCCGGCT	GAGCAAGGAC	GAGATCGAGC
<i>L. cha</i>	<u>GGCATCTGA</u>	<u>ACGTGTCCGC</u>	GGAGGAGAAG	GGCACC GGCA	AGCGCAACCA	GATCACCATC	ACCAACGACA	AGGGCCGGCT	GAGCAAGGAC	GAGATCGAGC
<i>L. maj</i>	<u>GGCATCTGA</u>	<u>ACGTGTCCGC</u>	GGAGGAGAAG	GGCACC GGCA	AGCGCAACCA	GATCACCATC	ACCAACGACA	AGGGCCGGCT	GAGCAAGGAC	GAGATCGAGC
<i>L. ama</i>	<u>GGCATCTGA</u>	<u>ACGTGTCCGC</u>	GGAGGAGAAG	GGCACC GGCA	AGCGCAACCA	GATCACCATC	ACCAACGACA	AGGGCCGGCT	GAGCAAGGAC	GAGATCGAGC
<i>L. mex</i>	<u>GGCATCTGA</u>	<u>ACGTGTCCGC</u>	GGAGGAGAAG	GGCACC GGCA	AGCGCAACCA	GATCACCATC	ACCAACGACA	AGGGCCGGCT	GAGCAAGGAC	GAGATCGAGC
<i>L. lai</i>	<u>GGCATCTGA</u>	<u>ACGTGTCCGC</u>	GGAGGAGAAG	GGCACC GGCA	AGCGCAACCA	TATCACCATC	ACCAACGACA	AGGGCCGACT	GAGCAAGGAC	GAGATCGAGC
<i>L. bra</i>	<u>GGCATCTGA</u>	<u>ACGTGTCCGC</u>	GGAGGAGAAG	GGCACC GGCA	AGCGCAACCA	TATCACCATC	ACCAACGACA	AGGGCCGACT	GAGCAAGGAC	GAGATCGAGC
<i>L. guy</i>	<u>GGCATCTGA</u>	<u>ACGTGTCCGC</u>	GGAGGAGAAG	GGCACC GGCA	AGCGCAACCA	TATCACCATC	ACCAACGACA	AGGGCCGACT	GAGCAAGGAC	GAGATCGAGC
<i>L. nai</i>	<u>GGCATCTGA</u>	<u>ACGTGTCCGC</u>	GGAGGAGAAG	GGCACC GGCA	AGCGCAACCA	TATCACCATC	ACCAACGACA	AGGGCCGACT	GAGCAAGGAC	GAGATCGAGC
<i>L. sha</i>	<u>GGCATCTGA</u>	<u>ACGTGTCCGC</u>	GGAGGAGAAG	GGCACC GGCA	AGCGCAACCA	TATCACCATC	ACCAACGACA	AGGGCCGACT	GAGCAAGGAC	GAGATCGAGC

	1568	1578	1588	1598	1608	1618	1628	1638	1648	1658
<i>L. tro</i>	<u>GCATGGTGAA</u>	<u>CGACGC GATG</u>	AAGTACGAGG	AGGACGACAA	GGCGCAGCGC	GACCGCGTGG	AGGCAAGAA	CGGCTGGAG	AAGTACGCGT	ACTCGATGAA
<i>L. don</i>	<u>GCATGGTGAA</u>	<u>CGACGC GATG</u>	AAGTACGAGG	CGGACGACAG	GGCGCAGCGC	GACCGCGTGG	AGGCAAGAA	CGGCTGGAG	AAGTACGCGT	ACTCGATGAA
<i>L. inf</i>	<u>GCATGGTGAA</u>	<u>CGACGC GATG</u>	AAGTACGAGG	CGGACGACAG	GGCGCAGCGC	GACCGCGTGG	AGGCAAGAA	CGGCTGGAG	AAGTACGCGT	ACTCGATGAA
<i>L. cha</i>	<u>GCATGGTGAA</u>	<u>CGACGC GATG</u>	AAGTACGAGG	CGGACGACAG	GGCGCAGCGC	GACCGCGTGG	AGGCAAGAA	CGGCTGGAG	AAGTACGCGT	ACTCGATGAA
<i>L. maj</i>	<u>GCATGGTGAA</u>	<u>CGACGC GATG</u>	AAGTACGAGG	AGGACGACAA	GGCACAGCGC	GACCGCGTGG	AGGCAAGAA	CGGCTGGAG	AAGTACGCGT	ACTCGATGAA
<i>L. ama</i>	<u>GCATGGTGAA</u>	<u>CGACGC AATG</u>	AAGTACGAGG	CGGACGACAA	GGCGCAGCGC	GACCGCGTGG	AGGCAAGAA	CGGCTGGAG	AAGTACGCGT	ACTCGATGAA
<i>L. mex</i>	<u>GCATGGTGAA</u>	<u>CGACGC AATG</u>	AAGTACGAGG	CGGACGACAA	GGCGCAGCGC	GACCGCGTGG	AGGCAAGAA	CGGCTGGAG	AAGTACGCGT	ACTCGATGAA
<i>L. lai</i>	<u>GCATGGTGAA</u>	<u>CGATGCGTCG</u>	AAGTACGAGG	AGGCCGACAA	GATGCAGCGC	GACCGCGTGG	AGGCCAAGAA	CGGCTGGAG	AAGTACGCGT	ACTCGATGAA
<i>L. bra</i>	<u>GCATGGTGAA</u>	<u>CGATGCGTCG</u>	AAGTACGAGG	AGGCCGACAA	GATGCAGCGC	GACCGCGTGG	AGGCCAAGAA	CGGCTGGAG	AAGTACGCGT	ACTCGATGAA
<i>L. guy</i>	<u>GCATGGTGAA</u>	<u>CGATGCGTCG</u>	AAGTACGAGG	AGGCCGACAA	GATGCAGCGC	GACCGCGTGG	AGGCCAAGAA	CGGCTGGAG	AAGTACGCGT	ACTCGATGAA
<i>L. nai</i>	<u>GCATGGTGAA</u>	<u>CGATGCGTCG</u>	AAGTACGAGG	AGGCCGACAA	GATGCAGCGC	GACCGCGTGG	AGGCCAAGAA	CGGCTGGAG	AAGTACGCGT	ACTCGATGAA
<i>L. sha</i>	<u>GCATGGTGAA</u>	<u>CGATGCGTCG</u>	AAGTACGAGG	AGGCCGACAA	GATGCAGCGC	GACCGCGTGG	AGGCCAAGAA	CGGCTGGAG	AAGTACGCGT	ACTCGATGAA

Figura 1 - Sequência parcial de nucleotídeos do gene *hsp70* e mapeamento de polimorfismos. Alinhamento de um fragmento de 380 pb do gene *hsp70* de 12 diferentes espécies de *Leishmania* com sequências obtidas no GenBank. A numeração dos nucleotídeos está baseada no tamanho completo do gene. As bases sublinhadas representam o posicionamento dos iniciadores utilizados neste trabalho. As bases duplamente sublinhadas representam segmentos onde mais de um iniciador se associam. As bases destacadas em vermelho indicam as posições dos polimorfismos. (*L. tro*): *L. (L.) tropica*; (*L. don*): *L. (L.) donovani*; (*L. inf*): *L. (L.) infantum*; (*L. cha*): *L. (L.) infantum chagasi*; (*L. maj*): *L. (L.) major*; (*L. ama*): *L. (L.) amazonensis*; (*L. mex*): *L. (L.) mexicana*; (*L. lai*): *L. (V.) lainsoni*; (*L. bra*): *L. (V.) braziliensis*; (*L. guy*): *L. (V.) guyanensis*; (*L. nai*): *L. (V.) naiffi* e (*L. sha*): *L. (V.) shawi*.

	1668	1678	1688	1698	1708	1718	1728	1738	1748	1758
<i>L. tro</i>	<u>GAACACGCTC</u>	<u>AGCGACTCGA</u>	<u>ACGTGTCCGG</u>	<u>CAAGCTGGAA</u>	<u>GATAGCGACA</u>	<u>AGGCCACGCT</u>	<u>GAACAAGGAG</u>	<u>ATCGACGTGG</u>	<u>TGCTGGAGTG</u>	<u>GCTGAGCAGC</u>
<i>L. don</i>	<u>GAACACGCTC</u>	<u>GGCGACTCGA</u>	<u>ACGTGTCCGG</u>	<u>CAAGCTGGAC</u>	<u>GATAGCGACA</u>	<u>AGGCCACGCT</u>	<u>GAACAAGGAG</u>	<u>ATCGACGTGA</u>	<u>CGCTGGAGTG</u>	<u>GCTGAGCAGC</u>
<i>L. inf</i>	<u>GAACACGCTC</u>	<u>GGCGACTCGA</u>	<u>ACGTGTCCGG</u>	<u>CAAGCTGGAC</u>	<u>GATAGCGACA</u>	<u>AGGCCACGCT</u>	<u>GAACAAGGAG</u>	<u>ATCGACGTGA</u>	<u>CGCTGGAGTG</u>	<u>GCTGAGCAGC</u>
<i>L. cha</i>	<u>GAACACGCTC</u>	<u>GGCGACTCGA</u>	<u>ACGTGTCCGG</u>	<u>CAAGCTGGAC</u>	<u>GATAGCGACA</u>	<u>AGGCCACGCT</u>	<u>GAACAAGGAG</u>	<u>ATCGACGTGA</u>	<u>CGCTGGAGTG</u>	<u>GCTGAGCAGC</u>
<i>L. maj</i>	<u>GAACACGCTC</u>	<u>AGCGACTCGA</u>	<u>ACGTGTCCGG</u>	<u>CAAGCTGGAC</u>	<u>GATAGCGACA</u>	<u>AGGCCACGCT</u>	<u>GAACAAGGAG</u>	<u>ATCGACGCGG</u>	<u>CGCTGGAGTG</u>	<u>GCTGAGCAGC</u>
<i>L. ama</i>	<u>GAACACGCTC</u>	<u>GGCGACTCGA</u>	<u>ACGTGTCCGG</u>	<u>CAAGCTGGAC</u>	<u>GACACCGACA</u>	<u>AGTCSACACT</u>	<u>GAACAAGGAG</u>	<u>ATCGAGGCGG</u>	<u>CGCTGGAGTG</u>	<u>GCTGAGCAGC</u>
<i>L. mex</i>	<u>GAACACGCTC</u>	<u>GGCGACTCGA</u>	<u>ACGTGTCCGG</u>	<u>CAAGCTGGAC</u>	<u>GACACCGACA</u>	<u>AGTCSACGCT</u>	<u>GAACAAGGAG</u>	<u>ATCGATGCGG</u>	<u>CGCTGGAGTG</u>	<u>GCTGAGCAGC</u>
<i>L. lai</i>	<u>GAACACGACC</u>	<u>TCCGACTCGA</u>	<u>ACGTGTCCGG</u>	<u>CAAGCTGGAG</u>	<u>GAGAGCGACA</u>	<u>AGGCCACGCT</u>	<u>GAACTCGGCG</u>	<u>ATCGACACGG</u>	<u>CGCTGGAGTG</u>	<u>GCTGAACAGC</u>
<i>L. bra</i>	<u>GAACACGGTC</u>	<u>TCCGACACGA</u>	<u>ACGTGTCCGG</u>	<u>CAAGCTGGAG</u>	<u>GAGAGCGACA</u>	<u>GGTCCGCGCT</u>	<u>GAACTCGGCG</u>	<u>ATCGACACGG</u>	<u>CGCTGGAGTG</u>	<u>GCTGAACAGC</u>
<i>L. guy</i>	<u>GAACACGATC</u>	<u>GCCGACACGA</u>	<u>ACGTGTCCGG</u>	<u>CAAGCTGGAG</u>	<u>GAGAGCGACA</u>	<u>GGACCCGCGCT</u>	<u>GAACTCGGCG</u>	<u>ATCGACACGG</u>	<u>CGCTGGAGTG</u>	<u>GCTGAACAGC</u>
<i>L. nai</i>	<u>GAACACGGTC</u>	<u>GCCGACACGA</u>	<u>ACGTGTCCGG</u>	<u>CAAGCTGGAG</u>	<u>GAGAGCGACA</u>	<u>GGACCCACGCT</u>	<u>GAACTCGGCG</u>	<u>ATCGACGCGG</u>	<u>CGCTGGAGTG</u>	<u>GCTGAACAGC</u>
<i>L. sha</i>	<u>GAACACGATC</u>	<u>GCCGACACGA</u>	<u>ACGTGTCCGG</u>	<u>CAAGCTGGAG</u>	<u>GAGAGCGACA</u>	<u>GGSCCGCGCT</u>	<u>GAACTCGGCG</u>	<u>ATCGACGCGG</u>	<u>CGCTGGAGTG</u>	<u>GCTGAACAGC</u>

	1768	1778	1788	1798	1808	1818	1828	1838		
<i>L. tro</i>	<u>AACCAGGAGG</u>	<u>CGCGAAGGA</u>	<u>GGAGTACGAG</u>	<u>CACAAGCAGA</u>	<u>AGGAGCTGGA</u>	<u>GAGCGTATGC</u>	<u>AACCCGATCA</u>	<u>TGACCAA---</u>		
<i>L. don</i>	<u>AACCAGGAGG</u>	<u>CGACGAAGGA</u>	<u>GGAGTACGAG</u>	<u>CACAAGCAGA</u>	<u>AGGAGCTGGA</u>	<u>GAGCGTATGC</u>	<u>AACCCGATCA</u>	<u>TGACCAAGAT</u>		
<i>L. inf</i>	<u>AACCAGGAGG</u>	<u>CGACGAAGGA</u>	<u>GGAGTACGAG</u>	<u>CACAAGCAGA</u>	<u>AGGAGCTGGA</u>	<u>GAGCGTATGC</u>	<u>AACCCGATCA</u>	<u>TGACCAA---</u>		
<i>L. cha</i>	<u>AACCAGGAGG</u>	<u>CGACGAAGGA</u>	<u>GGAGTACGAG</u>	<u>CACAAGCAGA</u>	<u>AGGAGCTGGA</u>	<u>GAGCGTATGC</u>	<u>AACCCGATCA</u>	<u>TGACCAA---</u>		
<i>L. maj</i>	<u>AACCAGGAGG</u>	<u>CGACGAAGGA</u>	<u>GGAGTACGAG</u>	<u>CACAGGCAGA</u>	<u>AGGAGCTGGA</u>	<u>GAGCGTATGC</u>	<u>AACCCGATCA</u>	<u>TGACCAA---</u>		
<i>L. ama</i>	<u>AACCAGGAGG</u>	<u>CAACGAAGGA</u>	<u>GGAGTATGAG</u>	<u>CACARGCAGA</u>	<u>AGGAGCTGGA</u>	<u>GAACGTATGC</u>	<u>AACCCGATCA</u>	<u>TGACCAA---</u>		
<i>L. mex</i>	<u>AACCAGGAGG</u>	<u>CGACGAAGGA</u>	<u>GGAGTATGAG</u>	<u>CACAAGCAGA</u>	<u>AGGAGCTGGA</u>	<u>GAACGTATGC</u>	<u>AACCCGATCA</u>	<u>TGACCAA---</u>		
<i>L. lai</i>	<u>AACCAGGAGG</u>	<u>CSTCGAAGGA</u>	<u>AGAGTACGAG</u>	-----	-----	-----	-----	-----		
<i>L. bra</i>	<u>AACCAGGAGG</u>	<u>CSTCGAAGGA</u>	<u>AGAGTACGAG</u>	-----	-----	-----	-----	-----		
<i>L. guy</i>	<u>AACCAGGAGG</u>	<u>CSTCGAAGGA</u>	<u>AGAGTACGAG</u>	<u>CACCGTCAGA</u>	<u>AGGAGCTGGA</u>	<u>GAGCAGATGC</u>	<u>AACCCGATCA</u>	<u>TGACCAA---</u>		
<i>L. nai</i>	<u>AACCAGGAGG</u>	<u>CSTCGAAGGA</u>	<u>AGAGTACGAG</u>	-----	-----	-----	-----	-----		
<i>L. sha</i>	<u>AACCAGGAGG</u>	<u>CSTCGAAGGA</u>	<u>AGAGTACGAG</u>	-----	-----	-----	-----	-----		

Figura 1 - Sequência parcial de nucleotídeos do gene *hsp70* e mapeamento de polimorfismos. (continuação)

Amplicon 1

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
<i>L. tro</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GCTCAGCGAC	TCGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAGGATAGC	GACAAGGCCA	CGCTGAACAA	GGAGATCGAC	
<i>L. don</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GCTCAGCGAC	TCGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAGGATAGC	GACAAGGCCA	CGCTGAACAA	GGAGATCGAC	
<i>L. inf</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GCTCAGCGAC	TCGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAGGATAGC	GACAAGGCCA	CGCTGAACAA	GGAGATCGAC	
<i>L. cha</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GCTCAGCGAC	TCGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAGGATAGC	GACAAGGCCA	CGCTGAACAA	GGAGATCGAC	
<i>L. maj</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GCTCAGCGAC	TCGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAGGATAGC	GACAAGGCCA	CGCTGAACAA	GGAGATCGAC	
<i>L. ama</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GCTCAGCGAC	TCGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAGGATAGC	GACAAGGCCA	CGCTGAACAA	GGAGATCGAC	
<i>L. mex</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GCTCAGCGAC	TCGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAGGATAGC	GACAAGGCCA	CGCTGAACAA	GGAGATCGAT	
<i>L. lai</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GACTCAGCGAC	TCGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAGGAGAGC	GACAAGGCCA	CGCTGAACTC	GGCGATCGAC	
<i>L. bra</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GGTCTCAGCGAC	ACGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAGGAGAGC	GACAGGTCCG	CGCTGAACTC	GGCGATCGAC	
<i>L. guy</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GATCGCAGCGAC	ACGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAGGAGAGC	GACAGGACCG	CGCTGAACTC	GGCGATCGAC	
<i>L. nai</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GGTCTCAGCGAC	ACGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAGGAGAGC	GACAGGACCA	CGCTGACCTC	GGCGATCGAC	
<i>L. sha</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GATCGCAGCGAC	ACGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAGGAGAGC	GACAGGGCCG	CGCTGAACTC	GGCGATCGAC	
	110	120	130	140	144						
<i>L. tro</i>	GTGGTGCTGG	AGTGGCTGAG	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA						
<i>L. don</i>	GTGACGCTGG	AGTGGCTGAG	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA						
<i>L. inf</i>	GTGACGCTGG	AGTGGCTGAG	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA						
<i>L. cha</i>	GTGACGCTGG	AGTGGCTGAG	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA						
<i>L. maj</i>	GCGGCGCTGG	AGTGGCTGAG	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA						
<i>L. ama</i>	GCGGCGCTGG	AGTGGCTGAG	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA						
<i>L. mex</i>	GCGGCGCTGG	AGTGGCTGAG	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA						
<i>L. lai</i>	ACGGCGCTGG	AGTGGCTGAA	CAACAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA						
<i>L. bra</i>	ACGGCGCTGG	AGTGGCTGAA	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA						
<i>L. guy</i>	ACGGCGCTGG	AGTGGCTGAA	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA						
<i>L. nai</i>	GCGGCGCTGG	AGTGGCTGAA	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA						
<i>L. sha</i>	GCGGCGCTGG	AGTGGCTGAA	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA						

Figura 2 - Sequência de nucleotídeos do Amplicon 1 e mapeamento de polimorfismos. Alinhamentos do Amplicon 1 para 12 diferentes espécies de *Leishmania* com sequências consensuais entre as obtidas no GenBank e determinadas no laboratório. A numeração dos nucleotídeos está baseada no tamanho de cada amplicon. As bases sublinhadas representam o posicionamento dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados. As bases destacadas em vermelho indicam as posições dos polimorfismos. As bases destacadas em cinza representam nucleotídeos polimórficos na sequência de DNA genômico que não estão presentes na sequência dos amplicons por estarem posicionados nas regiões onde os iniciadores se associam. (*L. tro*): *L. (L.) tropica*; (*L. don*): *L. (L.) donovani*; (*L. inf*): *L. (L.) infantum*; (*L. cha*): *L. (L.) infantum chagasi*; (*L. maj*): *L. (L.) major*; (*L. ama*): *L. (L.) amazonensis*; (*L. mex*): *L. (L.) mexicana*; (*L. lai*): *L. (V.) lainsoni*; (*L. bra*): *L. (V.) braziliensis*; (*L. guy*): *L. (V.) guyanensis*; (*L. nai*): *L. (V.) naiffi* e (*L. sha*): *L. (V.) shawi*.

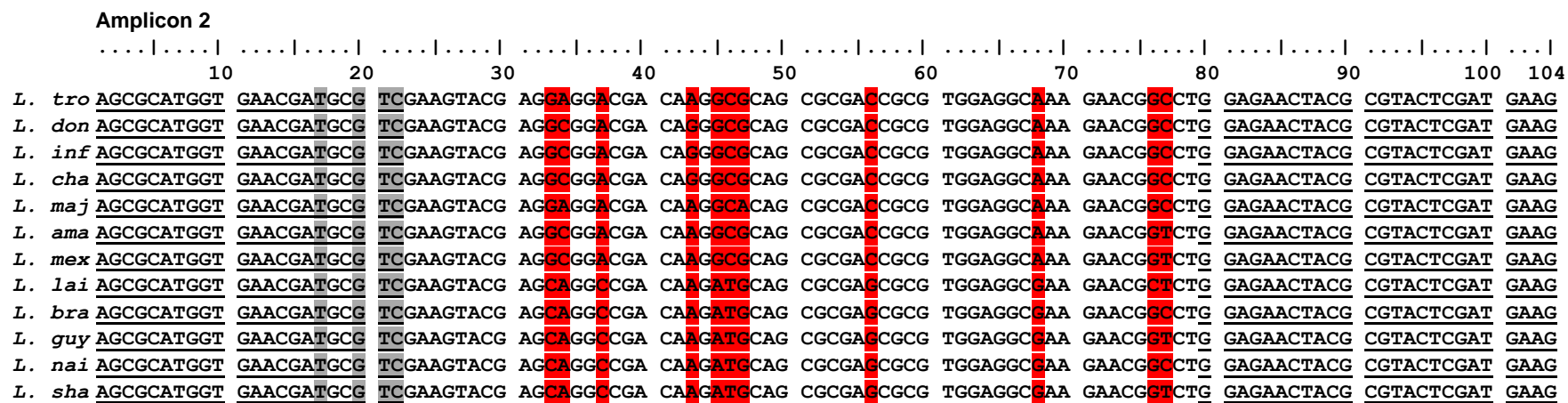


Figura 3 - Sequência de nucleotídeos do Amplicon 2 e mapeamento de polimorfismos. Alinhamentos do Amplicon 2 para 12 diferentes espécies de *Leishmania* com sequências consensuais entre as obtidas no GenBank e determinadas no laboratório. A numeração dos nucleotídeos está baseada no tamanho de cada amplicon. As bases sublinhadas representam o posicionamento dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados. As bases destacadas em vermelho indicam as posições dos polimorfismos. As bases destacadas em cinza representam nucleotídeos polimórficos na sequência de DNA genômico que não estão presentes na sequência dos amplicons por estarem posicionados nas regiões onde os iniciadores se associam. (*L. tro*): *L. (L.) tropica*; (*L. don*): *L. (L.) donovani*; (*L. inf*): *L. (L.) infantum*; (*L. cha*): *L. (L.) infantum chagasi*; (*L. maj*): *L. (L.) major*; (*L. ama*): *L. (L.) amazonensis*; (*L. mex*): *L. (L.) mexicana*; (*L. lai*): *L. (V.) lainsoni*; (*L. bra*): *L. (V.) braziliensis*; (*L. guy*): *L. (V.) guyanensis*; (*L. nai*): *L. (V.) naiffi* e (*L. sha*): *L. (V.) shawi*.

Amplicon 3

	10	20	30	40	50	60	69
<i>L. tro</i>	<u>GTCGACGCTG</u>	<u>AACAAGGAGA</u>	<u>TCGA</u> <u>CGTGGT</u>	GCTGGAGTGG	CTGAGCAGCA	ACCAGGAGGC	GTCGAAGGA
<i>L. don</i>	<u>GTCGACGCTG</u>	<u>AACAAGGAGA</u>	<u>TCGA</u> <u>CGTGGT</u>	GCTGGAGTGG	CTGAGCAGCA	ACCAGGAGGC	GTCGAAGGA
<i>L. inf</i>	<u>GTCGACGCTG</u>	<u>AACAAGGAGA</u>	<u>TCGA</u> <u>CGTGGT</u>	GCTGGAGTGG	CTGAGCAGCA	ACCAGGAGGC	GTCGAAGGA
<i>L. cha</i>	<u>GTCGACGCTG</u>	<u>AACAAGGAGA</u>	<u>TCGA</u> <u>CGTGGT</u>	GCTGGAGTGG	CTGAGCAGCA	ACCAGGAGGC	GTCGAAGGA
<i>L. maj</i>	<u>GTCGACGCTG</u>	<u>AACAAGGAGA</u>	<u>TCGA</u> <u>CGCGGC</u>	GCTGGAGTGG	CTGAGCAGCA	ACCAGGAGGC	GTCGAAGGA
<i>L. ama</i>	<u>GTCGACGCTG</u>	<u>AACAAGGAGA</u>	<u>TCGA</u> <u>CGCGGC</u>	GCTGGAGTGG	CTGAGCAGCA	ACCAGGAGGC	GTCGAAGGA
<i>L. mex</i>	<u>GTCGACGCTG</u>	<u>AACAAGGAGA</u>	<u>TCGA</u> <u>TGCGGC</u>	GCTGGAGTGG	CTGAGCAGCA	ACCAGGAGGC	GTCGAAGGA
<i>L. lai</i>	<u>GTCGACGCTG</u>	<u>AACAAGGAGA</u>	<u>TCGA</u> <u>CACGGC</u>	GCTGGAGTGG	CTGAACAGCA	ACCAGGAGGC	GTCGAAGGA
<i>L. bra</i>	<u>GTCGACGCTG</u>	<u>AACAAGGAGA</u>	<u>TCGA</u> <u>CACGGC</u>	GCTGGAGTGG	CTGAACAGCA	ACCAGGAGGC	GTCGAAGGA
<i>L. guy</i>	<u>GTCGACGCTG</u>	<u>AACAAGGAGA</u>	<u>TCGA</u> <u>CACGGC</u>	GCTGGAGTGG	CTGAACAGCA	ACCAGGAGGC	GTCGAAGGA
<i>L. nai</i>	<u>GTCGACGCTG</u>	<u>AACAAGGAGA</u>	<u>TCGA</u> <u>CGCGGC</u>	GCTGGAGTGG	CTGAACAGCA	ACCAGGAGGC	GTCGAAGGA
<i>L. sha</i>	<u>GTCGACGCTG</u>	<u>AACAAGGAGA</u>	<u>TCGA</u> <u>CGCGGC</u>	GCTGGAGTGG	CTGAACAGCA	ACCAGGAGGC	GTCGAAGGA

Figura 4 - Sequência de nucleotídeos do Amplicon 3 e mapeamento de polimorfismos. Alinhamentos do Amplicon 3 para 12 diferentes espécies de *Leishmania* com sequências consensuais entre as obtidas no GenBank e determinadas no laboratório. A numeração dos nucleotídeos está baseada no tamanho de cada amplicon. As bases sublinhadas representam o posicionamento dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados. As bases destacadas em vermelho indicam as posições dos polimorfismos. As bases destacadas em cinza representam nucleotídeos polimórficos na sequência de DNA genômico que não estão presentes na sequência dos amplicons por estarem posicionados nas regiões onde os iniciadores se associam. (*L. tro*): *L. (L.) tropica*; (*L. don*): *L. (L.) donovani*; (*L. inf*): *L. (L.) infantum*; (*L. cha*): *L. (L.) infantum chagasi*; (*L. maj*): *L. (L.) major*; (*L. ama*): *L. (L.) amazonensis*; (*L. mex*): *L. (L.) mexicana*; (*L. lai*): *L. (V.) lainsoni*; (*L. bra*): *L. (V.) braziliensis*; (*L. guy*): *L. (V.) guyanensis*; (*L. nai*): *L. (V.) naiffi* e (*L. sha*): *L. (V.) shawi*.

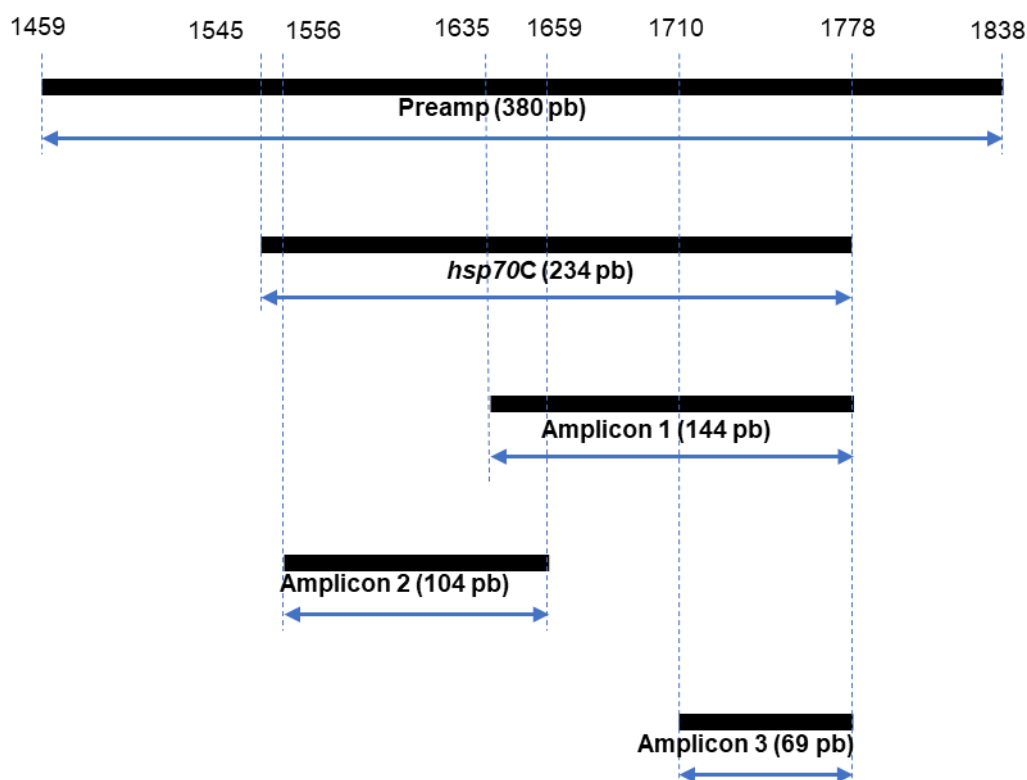


Figura 5 - Mapa de localização dos amplicons no gene *hsp70*. Representação gráfica da localização e tamanho dos fragmentos de DNA utilizados nesse estudo. A numeração indica o posicionamento de cada fragmento com relação à sequência completa do gene.

A determinação teórica de T_m para o Amplicon 1 evidenciou a possibilidade de segregação das espécies em cinco grupos: A) *L. (L.) tropica*; B) *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) infantum chagasi*; C) *L. (L.) major*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (V.) lainsoni*; D) *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*; e E) *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*. Para o Amplicon 2, as simulações resultaram na distinção de três grupos: A) *L. (L.) major*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) shawi*; B) *L. (L.) tropica*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) naiffi*; e C) *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) infantum chagasi*. Os valores simulados para o Amplicon 3 apontaram quatro grupos distintos: A) *L. (V.) lainsoni*; B) *L. (L.) tropica*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*; C) *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*; e D) *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis* (Figura 6, Tabela 3).

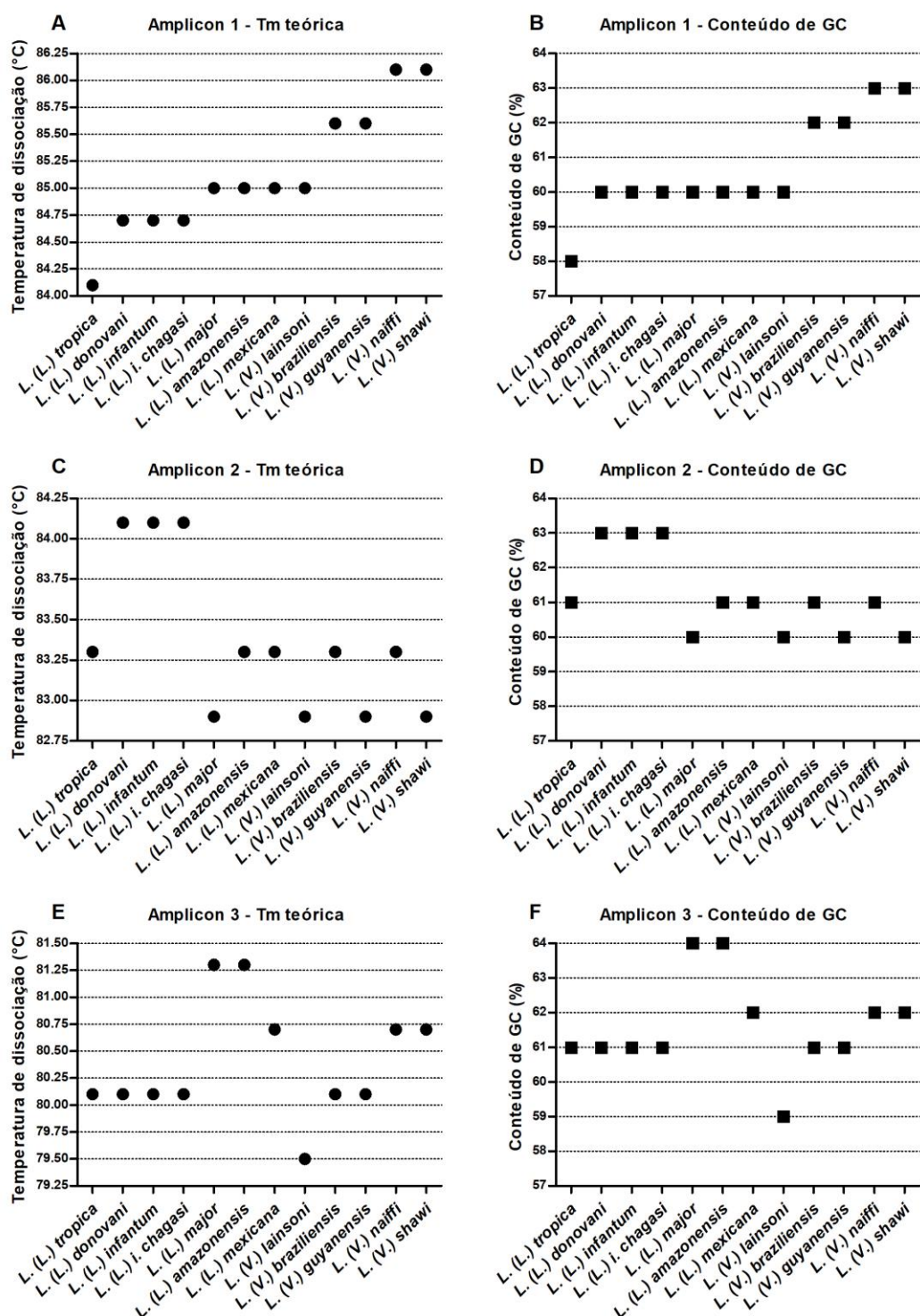


Figura 6 - Valores de Tm e %GC determinados *in silico*. Representação gráfica dos valores de temperatura de dissociação (A, C e E) e conteúdo de GC (B, D e F) calculados no aplicativo Oligocalc para os três blocos de sequência selecionados, nomeados como Amplicon 1, Amplicon 2 e Amplicon 3.

Tabela 3 - Determinação teórica de valores de temperatura de dissociação (Tm) e conteúdo de GC (%GC)

Amplicon 1				Amplicon 2				Amplicon 3			
Grupo	Espécie	Tm (°C)	% GC	Grupo	Espécie	Tm (°C)	% GC	Grupo	Espécie	Tm (°C)	% GC
A	<i>L. (L.) tropica</i>	84,1	58	A	<i>L. (L.) major</i>	82,9	60	A	<i>L. (V.) lainsoni</i>	79,5	59
B	<i>L. (L.) donovani</i>	84,7	60		<i>L. (V.) lainsoni</i>			<i>L. (L.) tropica</i>	80,1	61	
	<i>L. (L.) infantum</i>				<i>L. (L.) donovani</i>						
	<i>L. (L.) i. chagasi</i>				<i>L. (V.) guyanensis</i>						
C	<i>L. (L.) i. chagasi</i>	85	60	<i>L. (V.) shawi</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	83,3	61	B	<i>L. (L.) infantum</i>	80,7	62
	<i>L. (L.) major</i>			<i>L. (L.) mexicana</i>	<i>L. (L.) i. chagasi</i>						
	<i>L. (L.) amazonensis</i>			<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>						
	<i>L. (L.) mexicana</i>			<i>L. (V.) guyanensis</i>							
D	<i>L. (V.) lainsoni</i>	85,6	62	<i>L. (V.) naiffi</i>	<i>L. (L.) tropica</i>	84,1	63	C	<i>L. (L.) mexicana</i>	81,3	64
	<i>L. (V.) braziliensis</i>			<i>L. (L.) donovani</i>	<i>L. (V.) naiffi</i>						
	<i>L. (V.) guyanensis</i>			<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (V.) shawi</i>						
E	<i>L. (V.) naiffi</i>	86,1	63	<i>L. (L.) i. chagasi</i>	<i>L. (L.) major</i>	81,3	64	D	<i>L. (L.) major</i>	81,3	64
	<i>L. (V.) shawi</i>			<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>						

Os valores de Tm e %GC foram obtidos em simulações no aplicativo OligoCalc⁸⁷.

Matrizes comparativas do número de nucleotídeos polimórficos e variações entre valores de T_m foram montadas com o propósito de se visualizar as relações entre esses parâmetros para os três amplicons. Entre as espécies comparadas o número de nucleotídeos polimórficos variou de 0 a 17 (até 11,8%), 0 a 10 (até 9,6%) e de 0 a 5 (até 7,3%) nas análises dos amplicons 1, 2 e 3, respectivamente. Para os agrupamentos formados nos três amplicons, a menor diferença observada entre as T_m teóricas foi de 0,3°C, valor superior ao limite de precisão do equipamento que determina experimentalmente a T_m utilizando o protocolo padronizado neste trabalho, que é de 0,2°C. As comparações entre os valores de T_m calculados e número de nucleotídeos polimórficos entre as espécies estão dispostas nas Tabelas 4, 5 e 6.

Uma possível variabilidade intraespecífica nas sequências desses amplicons também foi avaliada *in silico*. 186 sequências de *hsp70* disponíveis no GenBank de diversas cepas de *L. (L.) tropica*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (M.) martiniquensis* e *L. siamensis* foram alinhadas e analisadas para determinação das T_m teóricas e índices de identidade para os Amplicons 1, 2. (Tabela S1 do Anexo A). Das sequências analisadas, somente as de duas cepas de *L. (L.) infantum* (MCAN/IR/96/LON-49 e LEM75/zymodeme1) e uma de *L. siamensis* (isolado PCM2) apresentaram valores teóricos de T_m do Amplicon 1 com diferença maior que 0,3°C quando comparados com os obtidos para as outras cepas da mesma espécie. Diferenças como essa também foram encontradas nas T_m teóricas do Amplicon 2 de três isolados de *L. (V.) braziliensis* e dois de *L. (V.) naiffi*.

Tabela 4 - Matrizes de comparação para o Amplicon 1

A - Quantidade de nucleotídeos polimórficos											
<i>tro</i>	<i>don</i>	<i>inf</i>	<i>cha</i>	<i>maj</i>	<i>ama</i>	<i>mex</i>	<i>lai</i>	<i>bra</i>	<i>guy</i>	<i>nai</i>	<i>sha</i>
<i>tro</i>	4	4	4	3	10	9	14	16	16	15	14
	<i>don</i>	0	0	3	8	7	14	16	15	14	13
		<i>inf</i>	0	3	8	7	14	16	15	14	13
			<i>cha</i>	3	8	7	14	16	15	14	13
				<i>maj</i>	7	6	12	14	14	13	12
					<i>ama</i>	2	17	17	17	16	16
						<i>mex</i>	16	16	16	15	15
							<i>lai</i>	7	7	9	7
								<i>bra</i>	3	5	4
									<i>guy</i>	4	2
										<i>nai</i>	4
											<i>sha</i>
B - Diferença entre Tm											
<i>tro</i>	<i>don</i>	<i>inf</i>	<i>cha</i>	<i>maj</i>	<i>ama</i>	<i>mex</i>	<i>lai</i>	<i>bra</i>	<i>guy</i>	<i>nai</i>	<i>sha</i>
<i>tro</i>	0,6	0,6	0,6	0,9	0,9	0,9	0,9	1,5	1,5	2	2
	<i>don</i>	0	0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,9	0,9	1,4	1,4
		<i>inf</i>	0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,9	0,9	1,4	1,4
			<i>cha</i>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,9	0,9	1,4	1,4
				<i>maj</i>	0	0	0	0,6	0,6	1,1	1,1
					<i>ama</i>	0	0	0,6	0,6	1,1	1,1
						<i>mex</i>	0	0,6	0,6	1,1	1,1
							<i>lai</i>	0,6	0,6	1,1	1,1
								<i>bra</i>	0	0,5	0,5
									<i>guy</i>	0,5	0,5
										<i>nai</i>	0
											<i>sha</i>

Comparação entre o número de nucleotídeos polimórficos (A) e variações entre Tm teóricas (B) do Amplicon 1 entre as espécies *L. (L.) tropica (tro)*, *L. (L.) donovani (don)*, *L. (L.) infantum (inf)*, *L. (L.) infantum chagasi (cha)*, *L. (L.) major (maj)*, *L. (L.) amazonensis (ama)*, *L. (L.) mexicana (mex)*, *L. (V.) lainsoni (lai)*, *L. (V.) braziliensis (bra)*, *L. (V.) guyanensis (guy)*, *L. (V.) naiffi (nai)* e *L. (V.) shawi (sha)*.

Tabela 5 - Matrizes de comparação para o Amplicon 2

A - Quantidade de nucleotídeos polimórficos											
<i>tro</i>	<i>don</i>	<i>inf</i>	<i>cha</i>	<i>maj</i>	<i>ama</i>	<i>mex</i>	<i>lai</i>	<i>bra</i>	<i>guy</i>	<i>nai</i>	<i>sha</i>
<i>tro</i>	2	2	2	1	2	2	8	6	7	6	7
	<i>don</i>	0	0	3	2	2	10	8	9	8	9
		<i>inf</i>	0	3	2	2	10	8	9	8	9
			<i>cha</i>	3	2	2	10	8	9	8	9
				<i>maj</i>	3	3	9	7	8	7	8
					<i>ama</i>	0	8	8	7	8	7
						<i>mex</i>	8	8	7	8	7
							<i>lai</i>	2	1	2	1
								<i>bra</i>	1	0	1
									<i>guy</i>	1	0
										<i>nai</i>	1
											<i>sha</i>
B - Diferença entre Tm											
<i>tro</i>	<i>don</i>	<i>inf</i>	<i>cha</i>	<i>maj</i>	<i>ama</i>	<i>mex</i>	<i>lai</i>	<i>bra</i>	<i>guy</i>	<i>nai</i>	<i>sha</i>
<i>tro</i>	0,8	0,8	0,8	0,4	0	0	0,4	0	0,4	0	0,4
	<i>don</i>	0	0	1,2	0,8	0,8	1,2	0,8	1,2	0,8	1,2
		<i>inf</i>	0	1,2	0,8	0,8	1,2	0,8	1,2	0,8	1,2
			<i>cha</i>	1,2	0,8	0,8	1,2	0,8	1,2	0,8	1,2
				<i>maj</i>	0,4	0,4	0	0,4	0	0,4	0
					<i>ama</i>	0	0,4	0	0,4	0	0,4
						<i>mex</i>	0,4	0	0,4	0	0,4
							<i>lai</i>	0,4	0	0,4	0
								<i>bra</i>	0,4	0	0,4
									<i>guy</i>	0,4	0
										<i>nai</i>	0,4
											<i>sha</i>

Comparação entre o número de nucleotídeos polimórficos (A) e variações entre Tm teóricas (B) do Amplicon 2 entre as espécies *L. (L.) tropica* (*tro*), *L. (L.) donovani* (*don*), *L. (L.) infantum* (*inf*), *L. (L.) infantum chagasi* (*cha*), *L. (L.) major* (*maj*), *L. (L.) amazonensis* (*ama*), *L. (L.) mexicana* (*mex*), *L. (V.) lainsoni* (*lai*), *L. (V.) braziliensis* (*bra*), *L. (V.) guyanensis* (*guy*), *L. (V.) naiffi* (*nai*) e *L. (V.) shawi* (*sha*).

Tabela 6 - Matrizes de comparação para o Amplicon 3

A - Quantidade de nucleotídeos polimórficos											
<i>tro</i>	<i>don</i>	<i>inf</i>	<i>cha</i>	<i>maj</i>	<i>ama</i>	<i>mex</i>	<i>lai</i>	<i>bra</i>	<i>guy</i>	<i>nai</i>	<i>sha</i>
<i>tro</i>	2	2	2	2	3	3	5	4	4	3	3
	<i>don</i>	0	0	2	3	3	5	4	4	3	3
		<i>inf</i>	0	2	3	3	5	4	4	3	3
			<i>cha</i>	2	3	3	5	4	4	3	3
				<i>maj</i>	1	1	3	2	2	1	1
					<i>ama</i>	1	4	3	3	2	2
						<i>mex</i>	4	3	3	2	2
							<i>lai</i>	1	1	2	2
								<i>bra</i>	0	1	1
									<i>guy</i>	1	1
										<i>nai</i>	0
											<i>sha</i>
B - Diferença entre Tm											
<i>tro</i>	<i>don</i>	<i>inf</i>	<i>cha</i>	<i>maj</i>	<i>ama</i>	<i>mex</i>	<i>lai</i>	<i>bra</i>	<i>guy</i>	<i>nai</i>	<i>sha</i>
<i>tro</i>	0	0	0	1,2	1,2	0,6	0,6	0	0	0,6	0,6
	<i>don</i>	0	0	1,2	1,2	0,6	0,6	0	0	0,6	0,6
		<i>inf</i>	0	1,2	1,2	0,6	0,6	0	0	0,6	0,6
			<i>cha</i>	1,2	1,2	0,6	0,6	0	0	0,6	0,6
				<i>maj</i>	0	0,6	1,8	1,2	1,2	0,6	0,6
					<i>ama</i>	0,6	1,8	1,2	1,2	0,6	0,6
						<i>mex</i>	1,2	0,6	0,6	0	0
							<i>lai</i>	0,6	0,6	1,2	1,2
								<i>bra</i>	0	0,6	0,6
									<i>guy</i>	0,6	0,6
										<i>nai</i>	0
											<i>sha</i>

Comparação entre o número de nucleotídeos polimórficos (A) e variações entre Tm teóricas (B) do Amplicon 3 entre as espécies *L. (L.) tropica (tro)*, *L. (L.) donovani (don)*, *L. (L.) infantum (inf)*, *L. (L.) infantum chagasi (cha)*, *L. (L.) major (maj)*, *L. (L.) amazonensis (ama)*, *L. (L.) mexicana (mex)*, *L. (V.) lainsoni (lai)*, *L. (V.) braziliensis (bra)*, *L. (V.) guyanensis (guy)*, *L. (V.) naiffi (nai)* e *L. (V.) shawi (sha)*.

4.2 Especificidade e sensibilidade dos ensaios de HRM

Os ensaios de HRM foram realizados ao final de reações de PCR em tempo real. Os produtos gerados nessas reações foram submetidos a um fracionamento eletroforético para a verificação de seus tamanhos. Essas reações geraram amplicons com tamanhos esperados para os três pares de iniciadores empregados. Os Amplicons 1 e 3, de 144 pb e 69 pb, respectivamente, foram eficientemente produzidos quando o DNA de todas as espécies de *Leishmania* testadas foi utilizado como molde. O Amplicon 2, de 104 pb, foi produzido em maior quantidade quando o DNA de espécies do subgênero *L. (Viannia)* foi utilizado como molde, enquanto as reações que utilizaram DNA de espécies do subgênero *L. (Leishmania)* apresentaram amplificação menos intensa ou ausente (Figura 7).

Ao final de cada reação foram realizadas curvas de dissociação onde cada produto gerado teve os dados de sua dinâmica de dissociação registrados. Os dados gerados nesses testes permitiram a aquisição experimental da T_m e do perfil gráfico de dissociação de cada amplicon para cada uma das espécies testadas. Os valores médios de T_m e seus respectivos desvios padrão foram determinados em duplicatas em 3 experimentos independentes (Tabela 7) e comparados com os valores obtidos *in silico* (Figura 8).

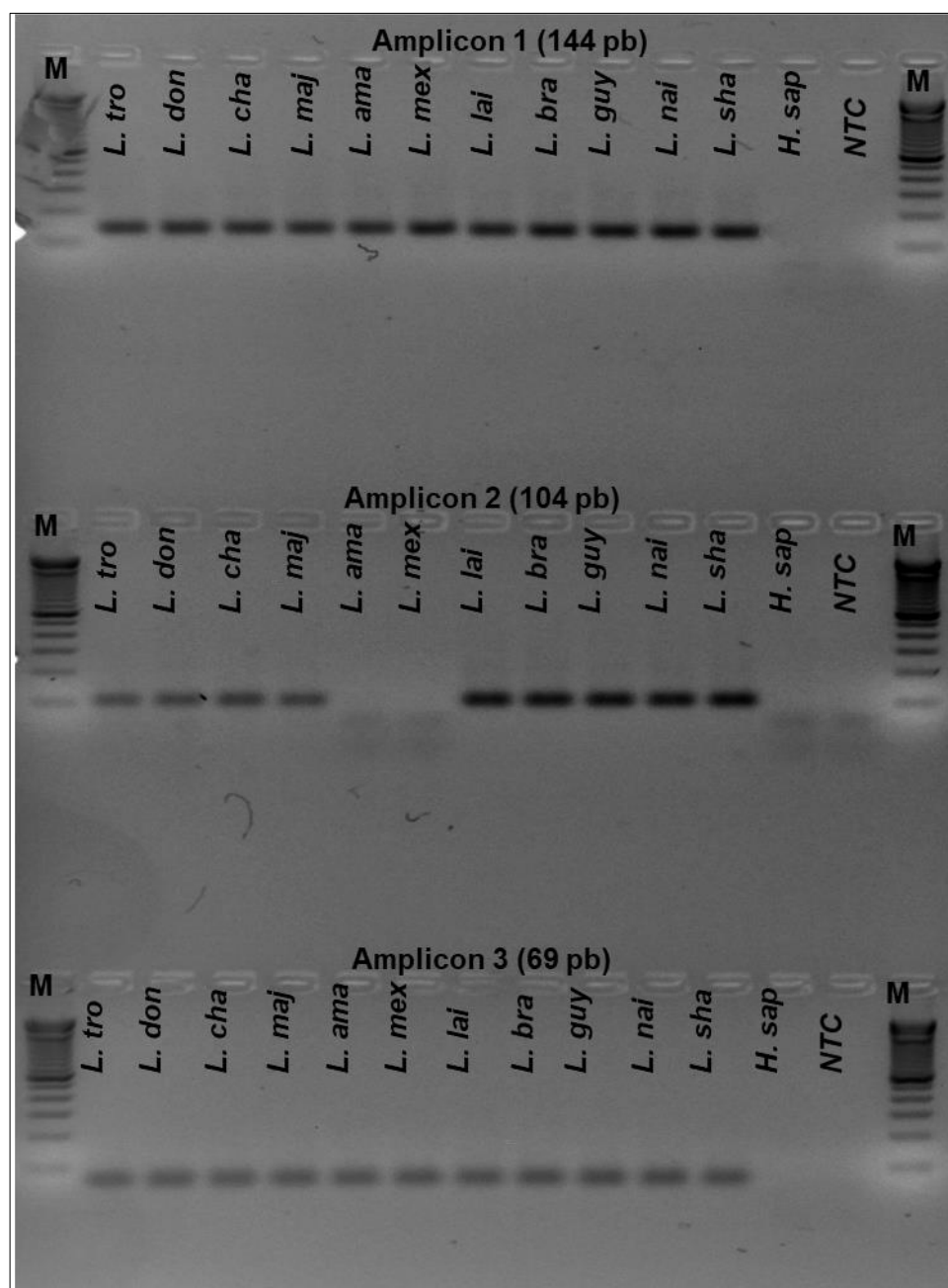


Figura 7 - Perfil eletroforético dos amplicons gerados por PCR em tempo real. Eletroforese em gel de agarose 3% dos Amplicons 1, 2 e 3 para confirmação dos tamanhos dos produtos de PCR gerados. (M): padrão de tamanho (100 bp DNA ladder – Thermo Scientific); (L. tro): *L. (L.) tropica*; (L. don): *L. (L.) donovani*; (L. cha): *L. (L.) infantum chagasi*; (L. maj): *L. (L.) major*; (L. ama): *L. (L.) amazonensis*; (L. mex): *L. (L.) mexicana*; (L. lai): *L. (V.) lainsoni*; (L. bra): *L. (V.) braziliensis*; (L. guy): *L. (V.) guyanensis*; (L. nai): *L. (V.) naiffi*; (L. sha): *L. (V.) shawi*; (H. sap): DNA humano; (NTC): controle negativo sem DNA.

Tabela 7 – Temperaturas de dissociação obtidas experimentalmente por análise de HRM

Espécies	Tm (°C) Amplicon 1	Tm (°C) Amplicon 2	Tm (°C) Amplicon 3
<i>L. (L.) tropica</i>	84,40 ± 0,02	83,96 ± 0,04 *	81,40 ± 0,03
<i>L. (L.) donovani</i>	85,01 ± 0,04	84,80 ± 0,01 *	81,30 ± 0,09
<i>L. (L.) i. chagasi</i>	85,04 ± 0,03	84,72 ± 0,01 *	81,25 ± 0,06
<i>L. (L.) major</i>	85,23 ± 0,03	83,46 ± 0,01 *	82,45 ± 0,12
<i>L. (L.) amazonensis</i>	85,39 ± 0,03	-	82,36 ± 0,08
<i>L. (L.) mexicana</i>	85,46 ± 0,06	-	81,76 ± 0,10
<i>L. (V.) lainsoni</i>	85,60 ± 0,01	84,07 ± 0,01	80,63 ± 0,08
<i>L. (V.) braziliensis</i>	85,86 ± 0,01	84,51 ± 0,03	81,25 ± 0,05
<i>L. (V.) guyanensis</i>	86,14 ± 0,02	84,01 ± 0	81,34 ± 0,08
<i>L. (V.) naiffi</i>	86,58 ± 0,11	84,48 ± 0,01	81,80 ± 0,08
<i>L. (V.) shawi</i>	86,80 ± 0,01	84,07 ± 0,01	81,88 ± 0,08

Os dados de temperatura de dissociação (Tm) foram obtidos de duplicatas técnicas de três experimentos independentes, utilizando cepas referências de *Leishmania*, com exceção de *. (*): experimento único realizado em duplicata; (-): ausência de amplificação.

O perfil gráfico das curvas de dissociação também foi utilizado para compor um painel de discriminação das espécies de *Leishmania* submetidas aos testes de HRM. A representação gráfica da variação na intensidade de fluorescência *versus* a variação de temperatura durante o processo de dissociação produziu assinaturas peculiares às espécies ou grupos de espécies. Utilizando-se esse parâmetro na tentativa de discriminar as espécies, os três amplicons foram avaliados. O Amplicon 1 produziu sete perfis distintos: 1) *L. (L.) tropica*; 2) *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum chagasi*; 3) *L. (V.) lainsoni*; 4) *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana*; 5) *L. (V.) braziliensis*; (6) *L. (V.) guyanensis* e 7) *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*. O Amplicon 2 produziu quatro perfis distintos: 1) *L. (L.) major*; 2) *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi* e *L. (L.) tropica*; 3) *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) naiffi*; e 4) *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (L.) donovani*. Por fim, quatro perfis foram produzidos pelo Amplicon 3: 1) *L. (V.) lainsoni*; 2) *L. (L.) tropica*, *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (L.) donovani*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*; 3) *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) naiffi*

e *L. (V.) shawi*; e 4) *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*. Os gráficos dos perfis obtidos estão representados na Figura 9.

Diferenças na eficiência de amplificação puderam ser observadas quando analisamos as curvas de amplificação nas reações de PCR em tempo real. Dados de Cq (ciclo de quantificação) marcam parâmetros relativos de quantificação de um alvo quando se compara quantidades normalizadas de amostras utilizadas como molde nas reações de PCR em tempo real. Os dados de Cq obtidos foram utilizados como parâmetro de eficiência nas reações para os três amplicons analisados (Tabela 8).

Partindo de mesmas quantidades iniciais de DNA molde (50ng), as reações de amplificação do Amplicon 1 produziram curvas com Cq de valores próximos entre todas as amostras (17,3 a 19,3), evidenciando que a eficiência de associação dos iniciadores ao DNA molde, para essa reação, é semelhante para todas as espécies testadas (Figura 10). Nas reações de amplificação do Amplicon 2, os menores valores de Cq foram obtidos das curvas referentes às espécies do subgênero *L. (Viannia)* (17 a 17,4), enquanto que para as espécies do subgênero *L. (Leishmania)* os valores foram superiores a 30 ou indeterminados, indicando que a funcionalidade dos iniciadores para essa reação é subgênero-específica. As reações de produção do Amplicon 3 para as espécies do subgênero *L. (Leishmania)* geraram valores de Cq ligeiramente menores do que os obtidos para as do subgênero *L. (Viannia)* (18,1 a 19,8 e 22,7 a 26,2, respectivamente). A intersecção das curvas de amplificação e o *threshold* analítico utilizados para essas comparações estão mostrados graficamente na Figura 10.

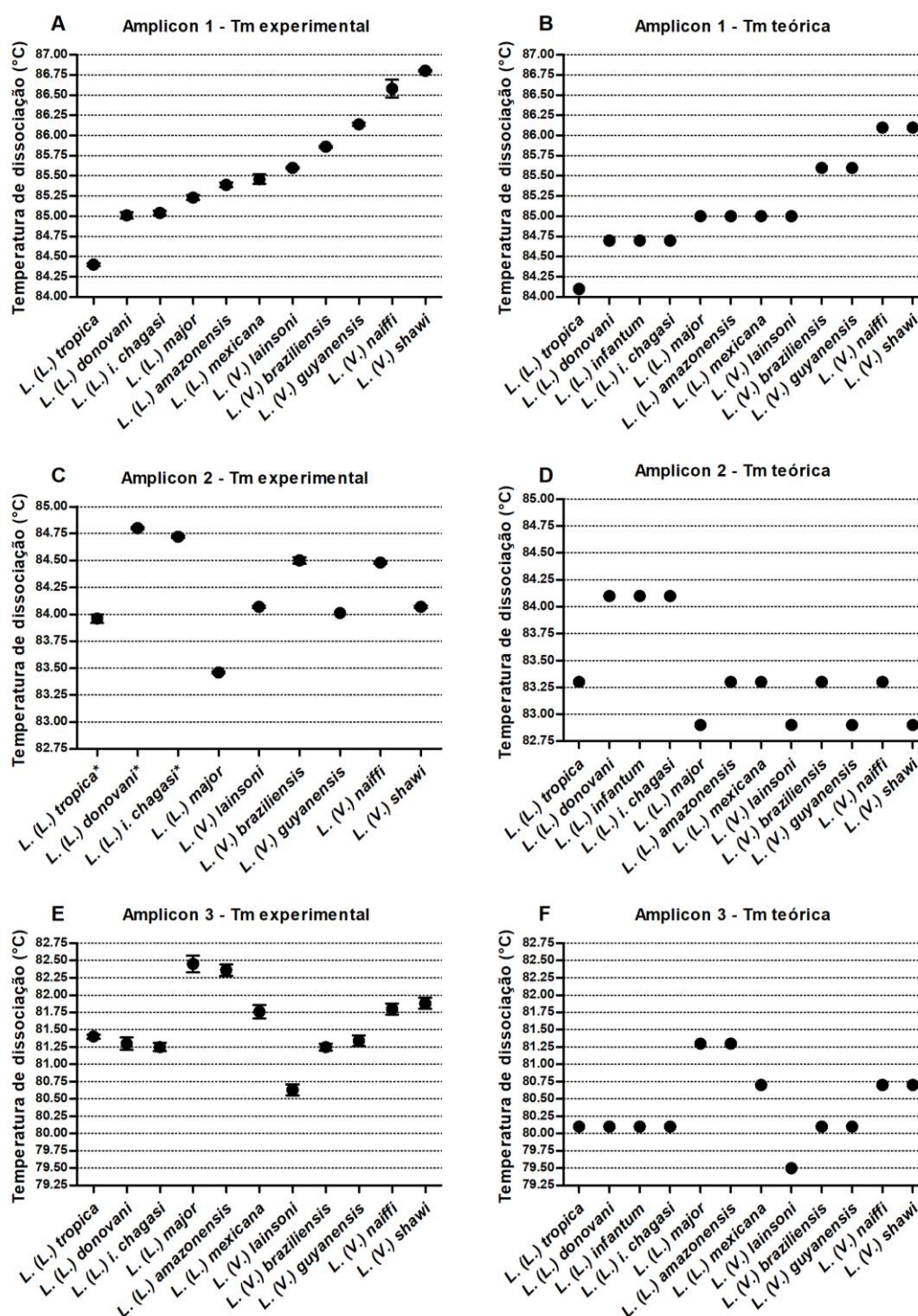


Figura 8 - Temperaturas de dissociação obtidas experimentalmente por ensaios de HRM em cepas-referência de *Leishmania* e comparação com dados teóricos. Gráfico de dispersão dos valores individuais de Tm para as espécies de *Leishmania* estudadas. Nos gráficos (A, C e E), cada ponto representa a média e o desvio padrão das Tm obtidas em duplicatas técnicas de 3 experimentos independentes, exceto *. (*): experimento único feito em duplicata. (B, D e F): resultados das análises *in silico*, como já apresentados na Figura 6.

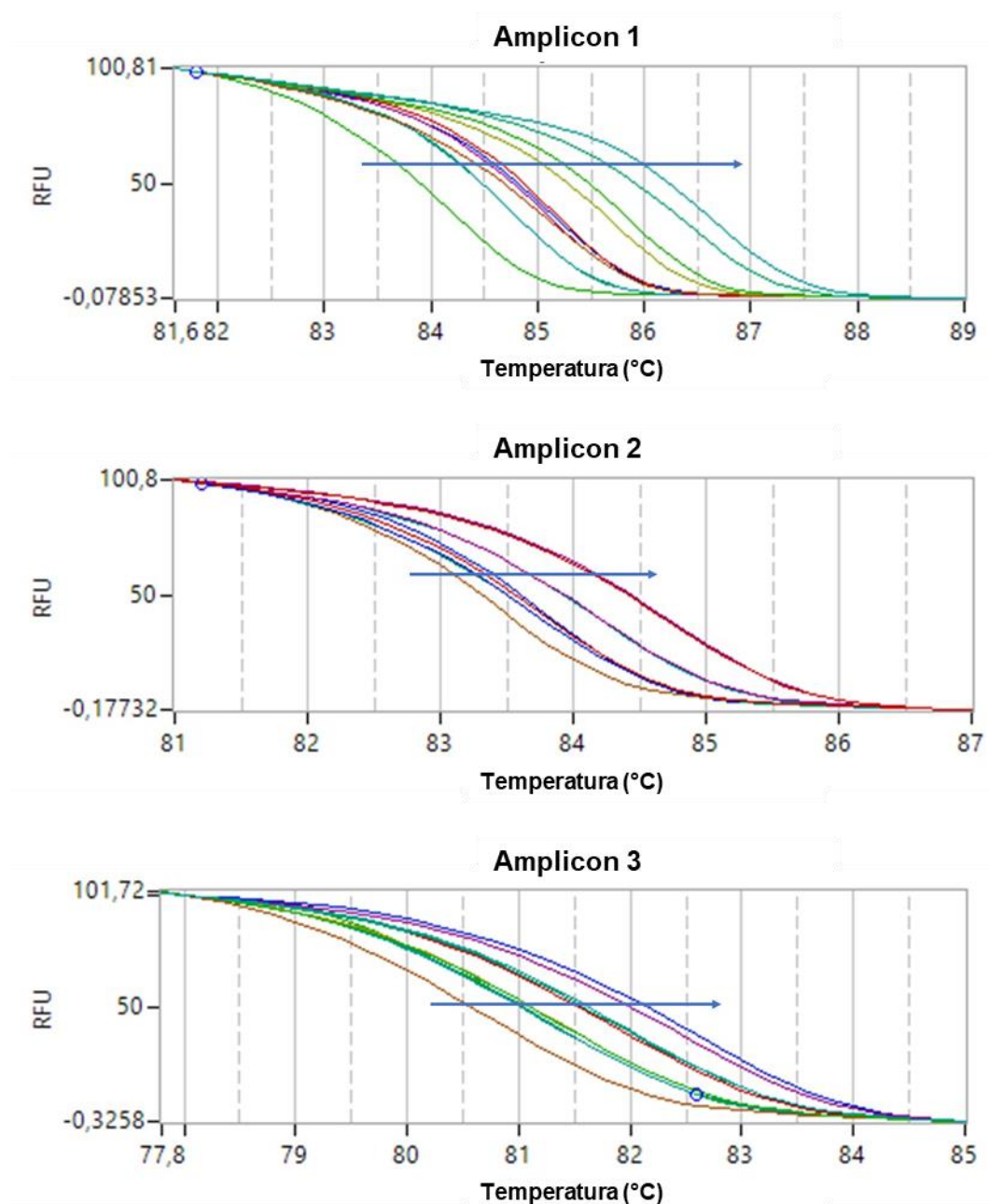


Figura 9 -

Representação gráfica das curvas de dissociação dos Amplicons 1, 2 e 3. Curvas de dissociação normalizadas produzidas com dados de fluorescência adquiridos após cada ensaio de PCR em tempo real. A seta azul indica a ordem em que as espécies estão dispostas nos gráficos, da esquerda para a direita: Amplicon 1: *L. (L.) tropica*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*; Amplicon 2: *L. (L.) major*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (L.) tropica*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (L.) donovani*; e Amplicon 3: *L. (V.) lainsoni*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (L.) donovani*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*. (RFU): unidades relativas de fluorescência.

Tabela 8 – Eficiência de amplificação dos alvos utilizando Cq como parâmetro.

Espécies	Cq Amplicon 1	Cq Amplicon 2	Cq Amplicon 3
<i>L. (L.) tropica</i>	18,7 ± 0,5	32,1 ± 0,3	19,0 ± 0,1
<i>L. (L.) donovani</i>	17,7 ± 0,3	30,6 ± 0,7	18,1 ± 0,5
<i>L. (L.) i. chagasi</i>	17,9 ± 0,2	30,9 ± 0,3	18,4 ± 0,2
<i>L. (L.) major</i>	19,3 ± 0,1	32,2 ± 0,3	19,8 ± 0,4
<i>L. (L.) amazonensis</i>	19,0 ± 0,1	-	19,6 ± 0,1
<i>L. (L.) mexicana</i>	17,5 ± 0,2	-	18,1 ± 0,0
<i>L. (V.) lainsoni</i>	17,6 ± 0,5	17,2 ± 0,3	22,7 ± 0,4
<i>L. (V.) braziliensis</i>	17,7 ± 0,5	17,1 ± 0,1	22,9 ± 0,3
<i>L. (V.) guyanensis</i>	17,3 ± 0,2	17,0 ± 0,1	23,0 ± 0,7
<i>L. (V.) naiffi</i>	17,6 ± 0,1	17,0 ± 0,1	25,7 ± 0,8
<i>L. (V.) shawi</i>	18,0 ± 0,4	17,4 ± 0,1	26,2 ± 0,5

Os valores de Cq (ciclo de quantificação) dos Amplicons 1, 2 e 3 foram determinados com *threshold* analítico de 200 em duplicata experimental para as cepas-referência de *Leishmania*.

Para avaliar se a quantidade inicial de DNA pode interferir na determinação das T_m, diluições seriadas contendo de 50 ng a 50 fg de DNA genômico das cepas-referência (quantidades correspondentes a cerca de 5,0 x 10⁵ a 0,5 parasita, respectivamente) foram utilizadas como molde para produzir cada um dos três amplicons (Figura 11). Para o Amplicon 2, somente DNA de espécies do subgênero *L. (Viannia)* foi testado. Esse ensaio evidenciou variações de T_m que sobrepuseram os perfis de alguns grupos de espécies no ensaio com os Amplicons 1 e 3. As variações de T_m observadas no ensaio com o Amplicon 2 não foram suficientes para sobrepor os perfis formados nos testes de padronização que utilizaram 50 ng de DNA molde. Não houve detecção de amplificação específica nos pontos de diluição onde menos de 500 pg de DNA genômico das espécies do subgênero *L. (Viannia)* foram utilizados como molde para a produção de Amplicon 3.

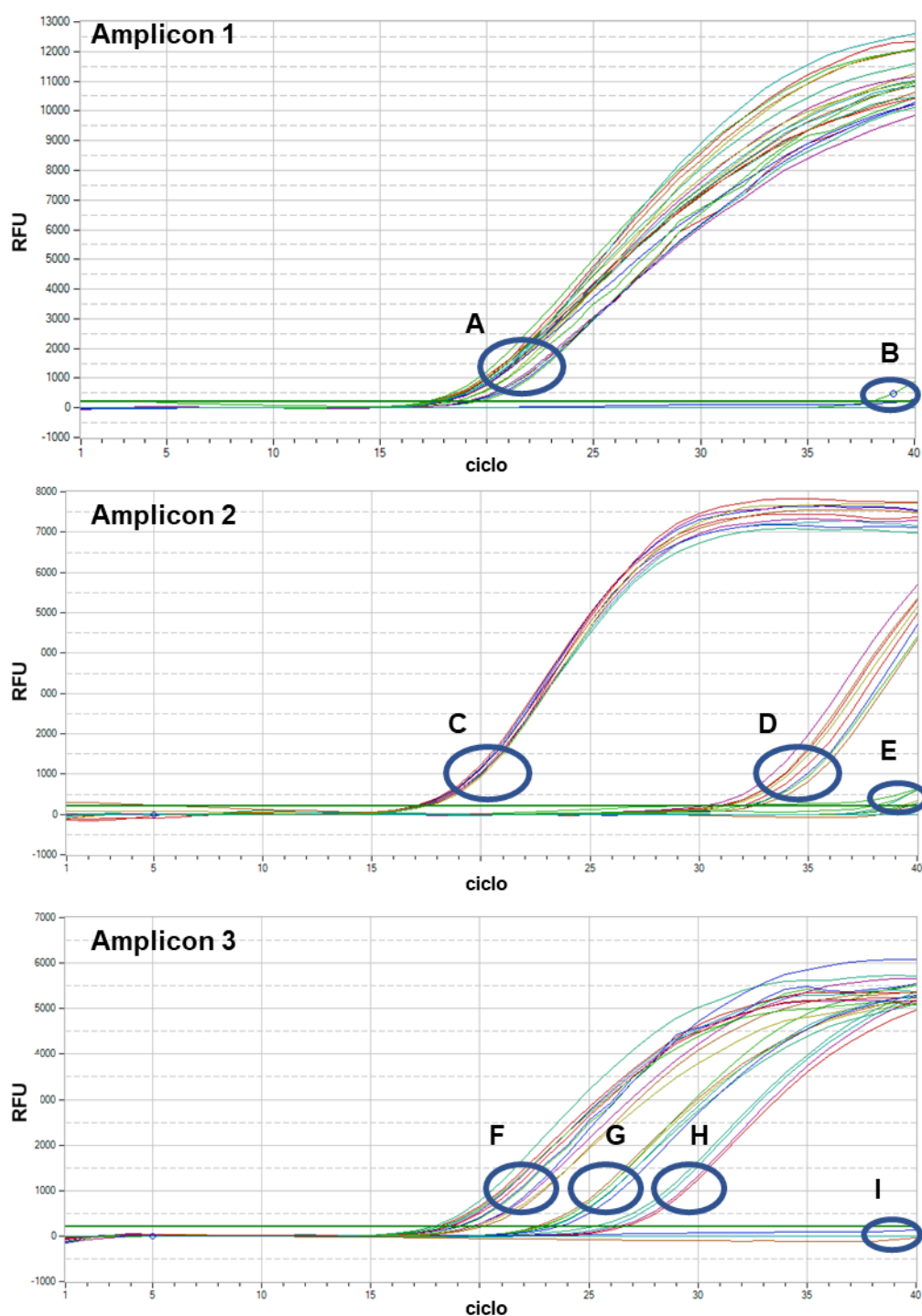


Figura 10 - Eficiência de amplificação dos alvos utilizando Cq (ciclo de quantificação) como parâmetro. Curvas de amplificação das reações de PCR em tempo real dos Amplicons 1, 2 e 3. Os dados de Cq foram determinados com *threshold* analítico de 200 em duplicata experimental para as espécies padrão de *Leishmania* na amplificação dos Amplicons 1, 2 e 3. (A): Todas as espécies de *Leishmania* testadas; (B), (E) e (I): controles negativos (DNA humano ou água utilizados como molde); (C): DNA de espécies do subgênero *L. (Viannia)*; (D): DNA de *L. (L.) tropica*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (L.) major*; (F): DNA de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana*; (G): DNA das demais espécies do subgênero *L. (Leishmania)*; (H): DNA de espécies do subgênero *L. (Viannia)*. (RFU): unidades relativas de fluorescência.

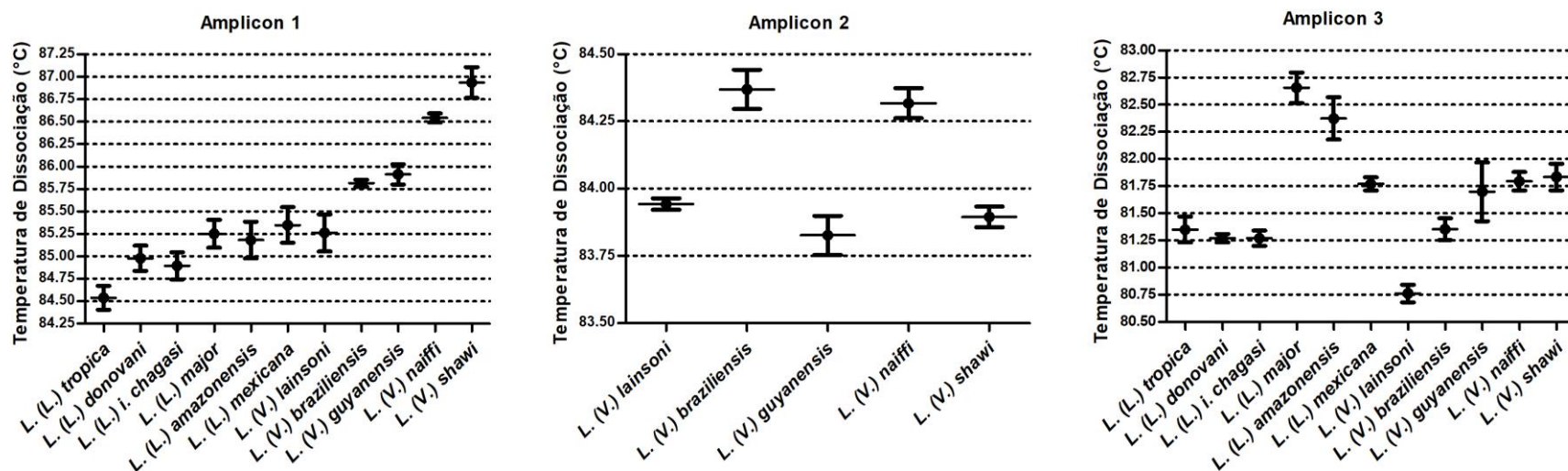


Figura 11 - Efeito da quantidade inicial de DNA alvo na determinação de valores de Tm. Gráfico de dispersão dos valores individuais de Tm para as espécies de *Leishmania* estudadas para os amplicons 1, 2 e 3. Cada ponto representa a média e o desvio padrão das Tm obtidas de amostras produzidas por diluição seriada de 50 ng a 50 fg de DNA genômico. Cada ponto de diluição foi medido em duplicata em 2 experimentos independentes.

Curvas padrão produzidas com plasmídeos recombinantes contendo o Amplicon 1 de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) lainsoni* também foram utilizadas para se determinar a sensibilidade dos testes (Figura 12). O limite de detecção foi de 10 cópias do alvo, determinado em reações de PCR em tempo real quantitativas. As retas produzidas por todas as curvas apresentaram coeficientes de correlação linear de 0,99 e eficiências variando entre 92,37 a 97,23% na quantificação de amostras contendo entre 10^6 e 10 cópias do Amplicon 1. Nos pontos contendo as diluições equivalentes a 1 cópia dos alvos não foi detectada amplificação de produto específico. Os parâmetros de eficiência e correlação linear determinados são compatíveis com os esperados em ensaios de quantificação de alvos de DNA por PCRs quantitativas (qPCR)⁹², que incluem determinações de carga parasitária.

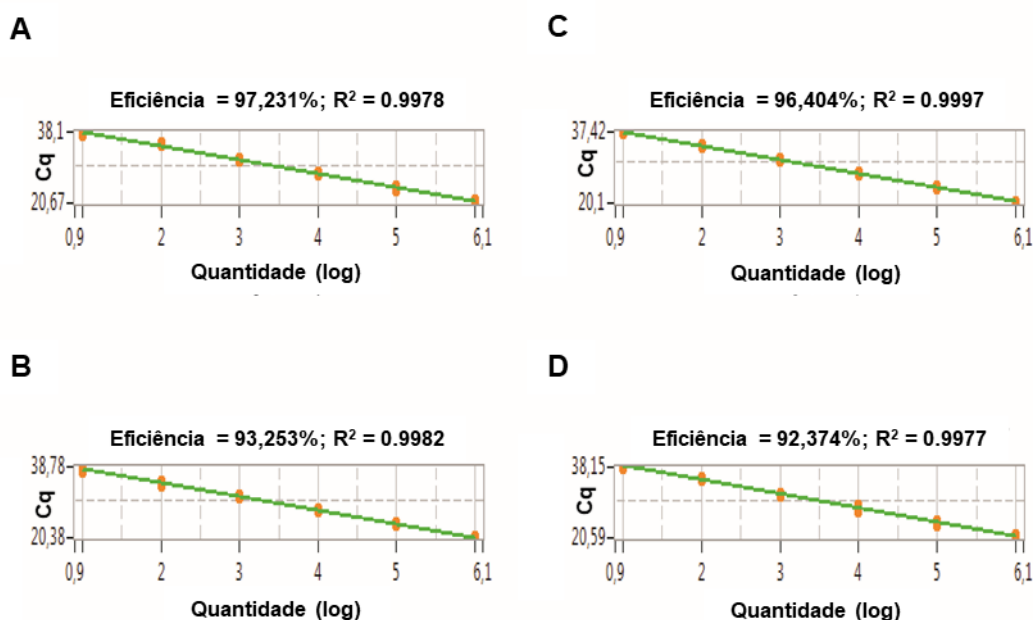


Figura 12 - Eficiência de reações de PCR quantitativas utilizando o Amplicon 1 como alvo. Curvas padrão foram construídas com plasmídeos recombinantes contendo as sequências do Amplicon 1 de *L. (L.) amazonensis* (A), *L. (L.) infantum chagasi* (B), *L. (V.) guyanensis* (C) ou *L. (V.) lainsoni* (D). O DNA utilizado como molde nesses ensaios foi preparado com diluições seriadas e testado em duplicatas técnicas.

Misturas de DNA de *Leishmania* com DNA humano foram submetidas aos testes de HRM com o objetivo de se observar a interferência do DNA do hospedeiro sobre a capacidade de identificação do parasita com base nos parâmetros obtidos nos ensaios. Reações de amplificação do Amplicon 1 foram realizadas então com duas proporções diferentes de DNA do hospedeiro e DNA de parasitas. Amostras com 50 ng de DNA total foram submetidas às reações: um grupo contendo 25 ng de DNA humano + 25 ng de DNA de *Leishmania* (1:1) e outro contendo 49,5 ng de DNA humano + 0,5 ng de DNA de *Leishmania* (100:1). O *software* do equipamento PikoReal96 (Thermo Fisher Scientific) utilizado para esses testes, com base nos parâmetros gerados nos testes como T_m e perfis de curvas, permite que amostras desconhecidas sejam comparadas com padrões referência e, assim, sejam identificadas. Essa identificação é feita automaticamente depois que o operador calibra e nomeia os padrões e nos é dada com um valor percentual de eficiência baseado nas comparações entre amostra e padrões. Para todos os testes, a identificação das amostras foi correta independentemente da proporção entre DNA de hospedeiro e DNA de parasita, ainda que a eficiência tenha sido menor quando o alvo estava mais diluído na amostra (Tabela 9).

O DNA genômico de organismos taxonomicamente próximos às espécies de *Leishmania* testadas foram submetidos ao teste de HRM para os Amplicons 1, 2 e 3, com o objetivo de se observar se possíveis amplificações nessas amostras gerariam uma identificação equivocada. O DNA genômico de *L. (Sauroleishmania) adleri*, *L. (S.) hoogstraali*, *L. (S.) tarentolae*, *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* e *Crithidia fasciculata* foram utilizados como alvo paralelamente com as cepas-referência.

A produção de Amplicon 1 foi observada em todas as amostras testadas. As amostras de *Trypanosoma* spp. apresentaram valores de T_m bastante distintas das apresentadas por *Leishmania* spp., *L. (Sauroleishmania)* spp. e *C. fasciculata* apresentaram valores de T_m próximos a algumas espécies padrão (Figura 13).

Valores de Cq maiores foram obtidos para as amostras de *Trypanosoma* spp. quando comparados com as outras espécies utilizadas como referência (Figura 14).

Tabela 9 – Eficiência de identificação de espécies de *Leishmania* na presença de DNA humano

Espécies	Eficiência de identificação (%)	
	Mistura 1:1	Mistura 100:1
<i>L. (L.) i. chagasi</i>	92,55	79,95
<i>L. (L.) amazonensis</i>	89,90	75,80
<i>L. (L.) lainsoni</i>	89,20	74,35
<i>L. (V.) braziliensis</i>	89,85	78,10
<i>L. (V.) guyanensis</i>	91,90	79,40
<i>L. (V.) naiffi</i>	95,05	81,95
<i>L. (V.) shawi</i>	93,00	81,55

A coluna “Identificação” mostra a identificação automática feita pelo *software* do equipamento às amostras postas em teste como desconhecidas com base em amostras calibradas como padrões. Cada condição foi testada em duplicata experimental.

O Amplicon 2 nas amostras de *L. (Sauroleishmania)* spp. e *C. fasciculata* foi produzido e detectado com valores de Cq superiores aos apresentados pelas espécies utilizadas como referência (Figura 14). Enquanto os valores de Tm obtidos para *L. (S.) tarentolae* e *C. fasciculata* se sobrepõem aos de algumas espécies referência, os obtidos de *L. (S.) adleri* e *L. (S.) hoogstraali* foram distintos (Figura 13). Não foi observada a amplificação desse alvo nas amostras de *Trypanosoma* spp..

Reações com DNA de *Trypanosoma* ssp., *C. fasciculata* e as espécies testadas de *L. (Sauroleishmania)* produziram Amplicon 3 com valores de Tm sobrepostos aos das cepas-referência de *Leishmania*. Porém, esse amplicon em *Trypanosoma* spp. foi detectado em ciclos tardios da reação.

4.3 Pré-amplificação de alvo

Oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam a região polimórfica amplificada na produção dos três amplicons foram empregados em reações de pré-amplificação, com o objetivo de enriquecer amostras com o alvo de identificação e, assim, aumentar tanto a sensibilidade quanto a especificidade dos testes. O DNA genômico de *L. (L.) amazonensis* com concentrações de 50 ng, 5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 500 fg, 50 fg e 5 fg por reação foi utilizado como molde em um teste de HRM para o Amplicon 1. Paralelamente, reações de pré-amplificação foram realizadas com as mesmas quantidades de DNA genômico como molde e 5 µL das pré-amplificações, diluídas 10, 100, 1000 ou 10000 vezes foram também submetidas ao teste de HRM para o mesmo alvo.

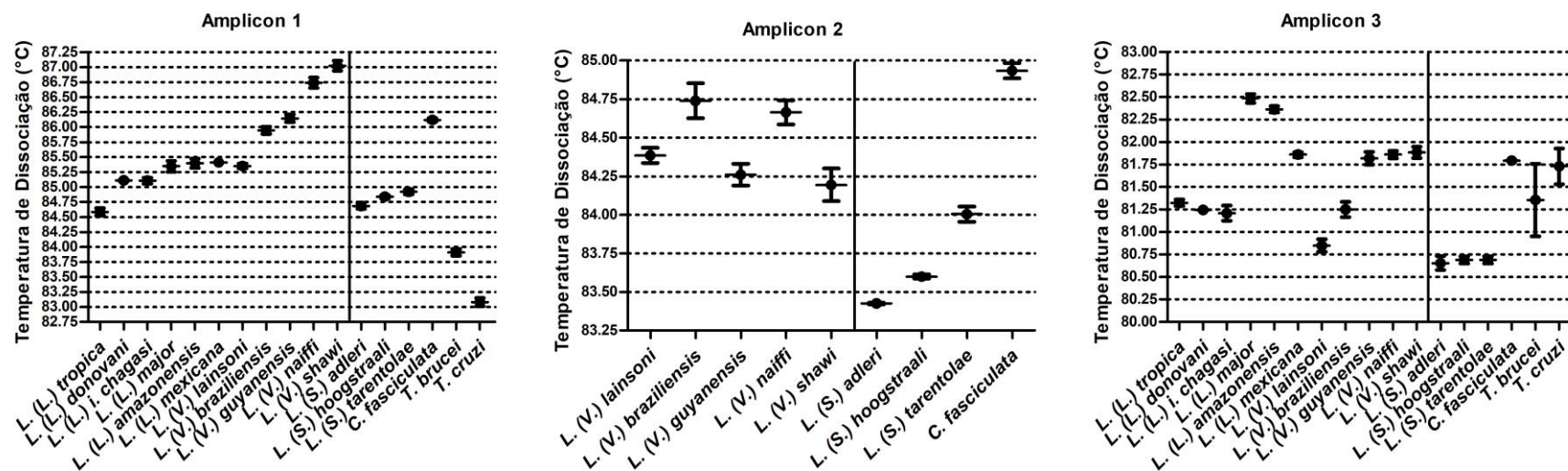


Figura 13 - Comparação entre temperaturas de dissociação obtidas nos ensaios de HRM com cepas-referência de *Leishmania* e outros tripanossomatídeos. Gráfico de dispersão dos valores individuais de T_m obtidas experimentalmente por ensaios de HRM. Cada ponto representa a média e o desvio padrão de duplicatas técnicas.

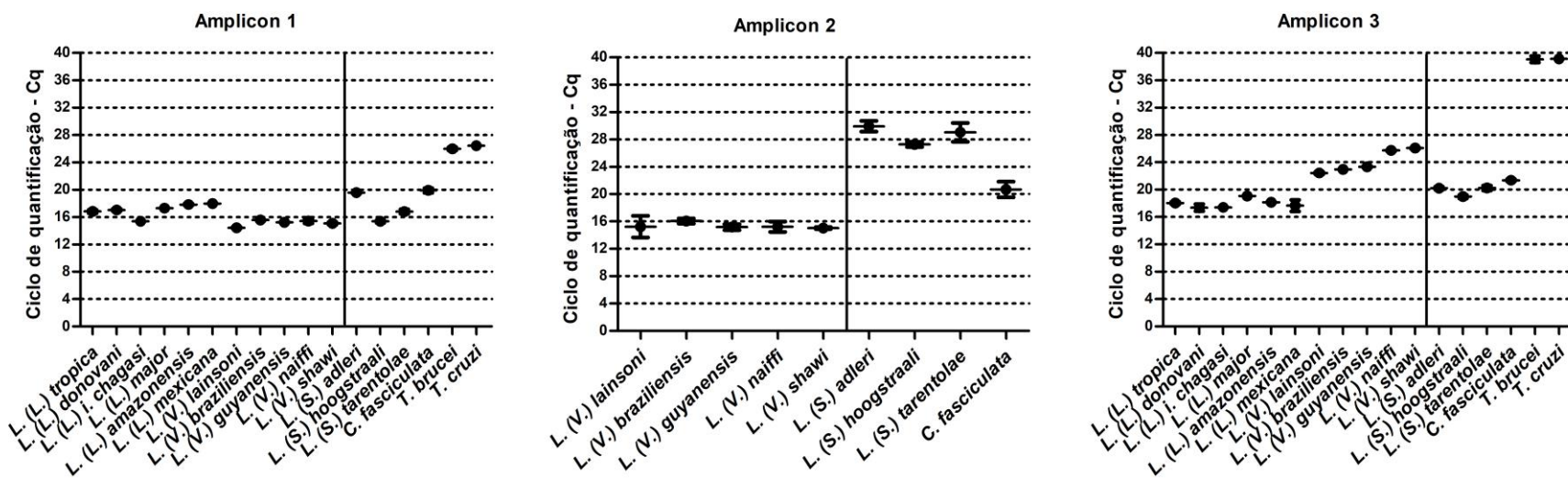


Figura 14 - Comparação entre valores de Cq obtidos nos ensaios de HRM com cepas-referência de *Leishmania* e outros tripanossomatídeos. Gráfico de dispersão dos valores individuais de Cq obtidos experimentalmente por ensaios de HRM. Cada ponto representa a média e o desvio padrão de duplicatas técnicas.

A menor quantidade detectada de DNA genômico, utilizando o Amplicon 1 como alvo, foi de 500 fg. Porém, com essa quantidade de DNA molde, foi observado um aumento de fluorescência resultante de interação entre oligonucleotídeos iniciadores, além da gerada por amplificação específica. A Figura 15 mostra a separação eletroforética dos produtos obtidos nesse teste. Nela podemos observar a presença de uma banda de tamanho inferior ao da banda específica de 144 pb, que também está presente no controle negativo (controle sem adição de DNA como molde) e que, portanto, é devida a formação de dímeros de iniciadores na reação. A fluorescência total é captada pelo equipamento de PCR em tempo real e registrada com valores de Cq que não correspondem à amplificação específica do alvo. Porém, os picos representativos da derivada da curva de dissociação podem discriminar a fluorescência específica da não específica.

No entanto, o emprego do passo de pré-amplificação aumentou a sensibilidade do teste em 10 vezes, ou seja, a presença de 50 fg de DNA genômico foi detectável. Além disso, não foi observado aumento inespecífico de fluorescência gerado pela interação entre os iniciadores, o que poderia ser explicado pelo aumento do consumo dos iniciadores em reações onde a quantidade de alvo específico está enriquecida. Por outro lado, a amplificação de fragmentos inespecíficos, de tamanho superior ao do produto específico, foi observada quando os produtos de pré-amplificação foram diluídos apenas 10 ou 100 vezes. Da mesma forma que produtos de interação entre iniciadores, esses produtos maiores geram fluorescência inespecífica que são registradas pelo equipamento, mas que podem ser discriminadas através das curvas de dissociação. A utilização de reações de pré-amplificação diluídas 1000 ou 10000 vezes como molde produziu exclusivamente o amplicon específico (Figura 15).

Os produtos inespecíficos de PCR também puderam ser detectados nas curvas de dissociação, com picos que apresentam valores distintos de T_m calculados pelo *software* de análise. Esses picos estão indicados na Figura 15.

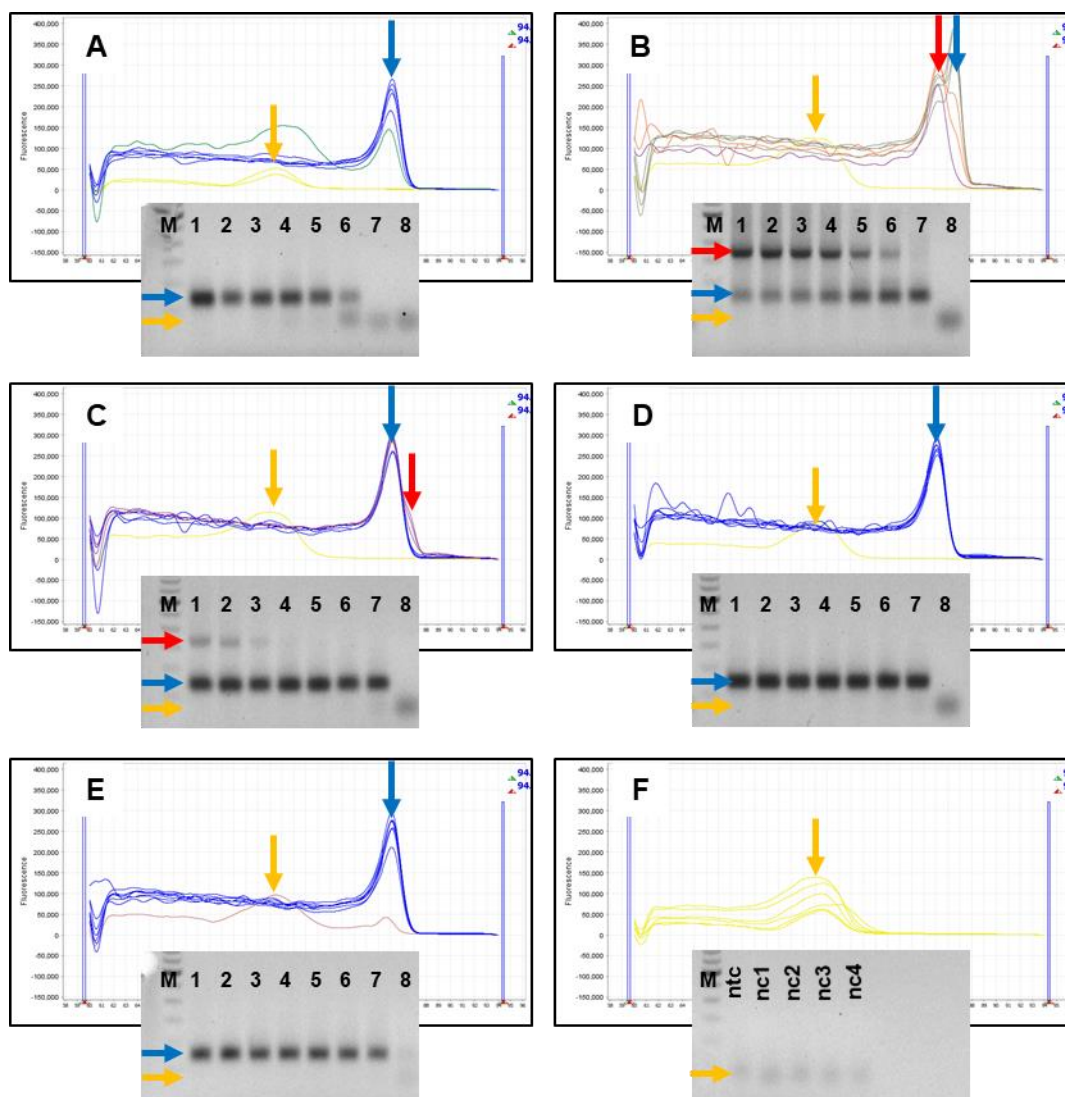


Figura 15 - Otimização do passo de pré-amplificação do Amplicon 1. 50 ng de DNA genômico (A) ou 5 uL de produtos de amplificação 10 (B), 100 (C), 1000 (D) ou 10000 vezes diluídos (E) foram utilizados como molde em um ensaio de PCR em tempo real com análise de HRM. As quantidades iniciais de DNA genômico utilizado como molde nas reações de pré-amplificação foram: 50 ng (1), 5 ng (2), 500 pg (3), 50 pg (4), 5 pg (5), 500 fg (6), 50 fg (7) e 5 fg (8). Nos gráficos, os picos representam a derivada das curvas de dissociação obtidas nas reações de PCR em tempo real. A separação eletroforética dos produtos de amplificação está representada junto a cada gráfico respectivo. As setas indicam a produção de produtos específicos de amplificação (azuis), produtos inespecíficos (vermelhas) ou dímeros de oligonucleotídeos iniciadores (amarelas). (ntc): controle negativo sem DNA da reação (A); (nc1), (nc2), (nc3) e (nc4): controles negativos das reações (B), (C), (D) e (E).

4.4 Simulação de infecções mistas

Com o objetivo de observar a cinética de dissociação do Amplicon 1 em amostras contendo DNA de duas espécies diferentes de *Leishmania*, na tentativa de simular experimentalmente infecções mistas, misturas de DNA genômico de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) braziliensis* foram feitas ao pares com sete diferentes proporções de cada uma delas, conforme Tabela 10.

Tabela 10 – Simulação experimental de infecções mistas

Mistura	1		2		3		4		5		6		7	
Espécie	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Proporção (%)	99	1	90	10	75	25	50	50	25	75	10	90	1	99
Massa (ng)	49,5	0,5	45	5	37,5	12,5	25	25	12,5	37,5	5	45	0,5	49,5

Misturas contendo o total de 50 ng de DNA genômico de *Leishmania*, aos pares de espécies (A+B), foram submetidas a ensaios de HRM para observações sobre a cinética de dissociação do Amplicon 1. Pares simulados: *L. (L.) amazonensis* + *L. (V.) braziliensis*; *L. (L.) amazonensis* + *L. (L.) infantum chagasi*; e *L. (V.) braziliensis* + *L. (L.) infantum chagasi*.

Como esperado para o Amplicon 1, quantidades iguais de DNA total das misturas (50 ng) produziram quantidades equivalentes de amplicons, com valores de Cq semelhantes o que pode ser observado nas curvas de amplificação obtidas para todas as amostras (Figura 16A). Como controle, amostras contendo exclusivamente DNA genômico de cada uma das espécies foram utilizadas e seus perfis de dissociação registrados para serem comparados aos das misturas (Figura 16B).

As curvas de dissociação e valores de T_m obtidos nesse experimento nos permite observar que o perfil termocinético das amostras varia de acordo com a composição das misturas de DNA genômico. Podem ser observados perfis e valores de T_m intermediários, que se tornam cada vez mais semelhantes às amostras controle (puras) conforme as concentrações de DNA de uma ou outra espécie se aproxima de 100% (Figura 16C-H).

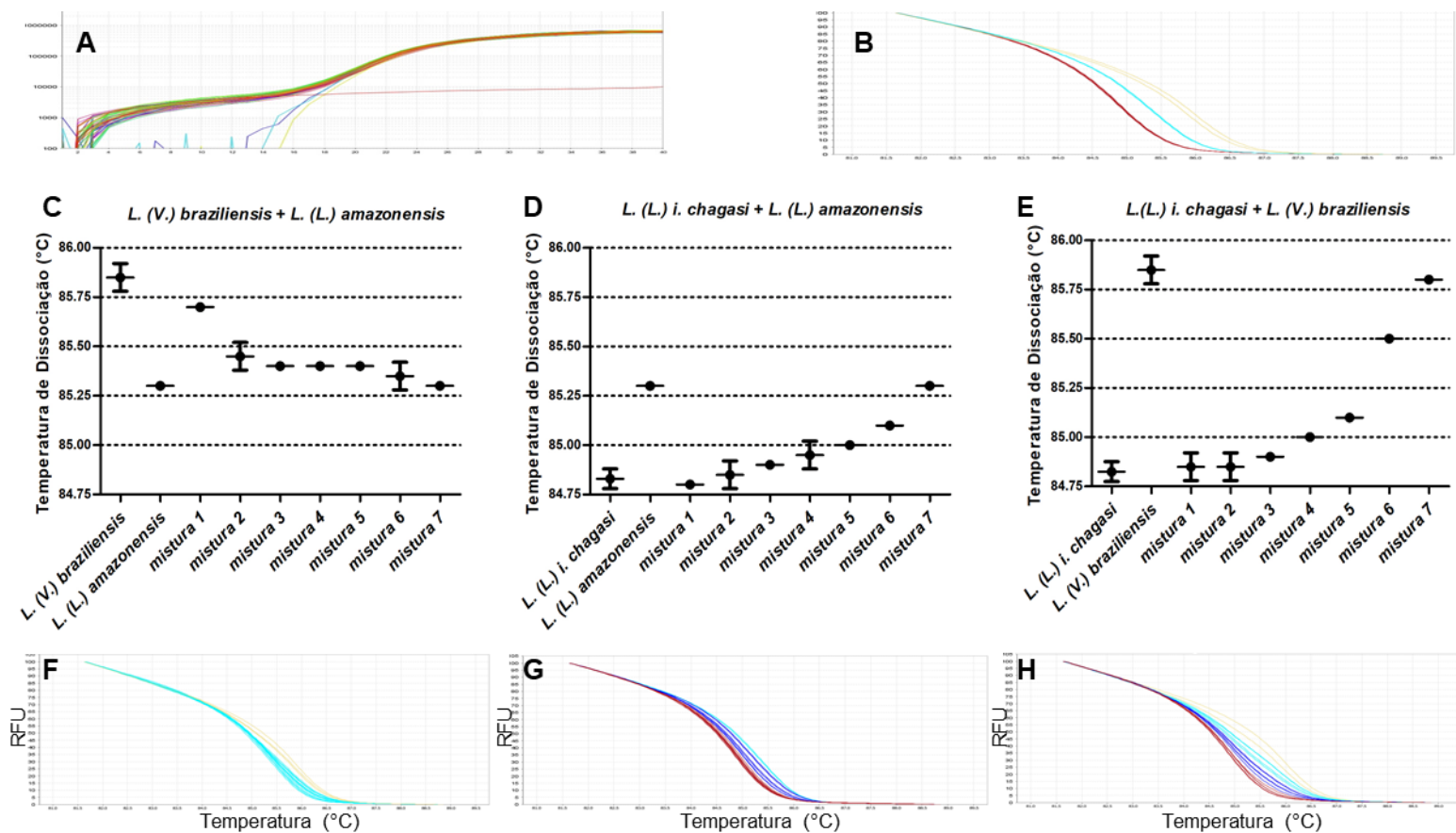


Figura 16 - Perfis de dissociação e valores de Tm obtidos de misturas de DNA genômico na simulação de infecções mistas. A: plotagem de amplificação das amostras puras, misturas e controle sem DNA; B: Perfis de dissociação de amostras contendo exclusivamente DNA genômico de *L. (L.) infantum chagasi* ou *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*; C, D e E: Valores de Tm obtidos das misturas de DNA genômico aos pares: *L. (V.) braziliensis* + *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum chagasi* + *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) infantum chagasi* + *L. (V.) braziliensis*, respectivamente; F, G, H: perfis de dissociação obtidos das misturas de DNA genômico aos pares: *L. (V.) braziliensis* + *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum chagasi* + *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) infantum chagasi* + *L. (V.) braziliensis*, respectivamente.

4.5 Comparação de experimentos realizados em equipamentos diferentes

Dois termocicladores de marcas diferentes, PikoReal96 (Thermo Fisher Scientific) ou StepOne (Life Technologies), e seus respectivos *softwares* de análise (PikoReal™ Software v2.1.158.545 ou High Resolution Melt Software v3.0.1) foram utilizados para realizar testes de HRM com reações preparadas segundo o mesmo protocolo. 50 ng de DNA genômico de 11 cepas-referência foram submetidos aos testes com os amplicons 1, 2 e 3 para terem seus perfis de dissociação e valores de T_m comparados. A cinética de dissociação foi representada de forma muito semelhante independentemente da máquina ou *software* utilizados (Figura 17).

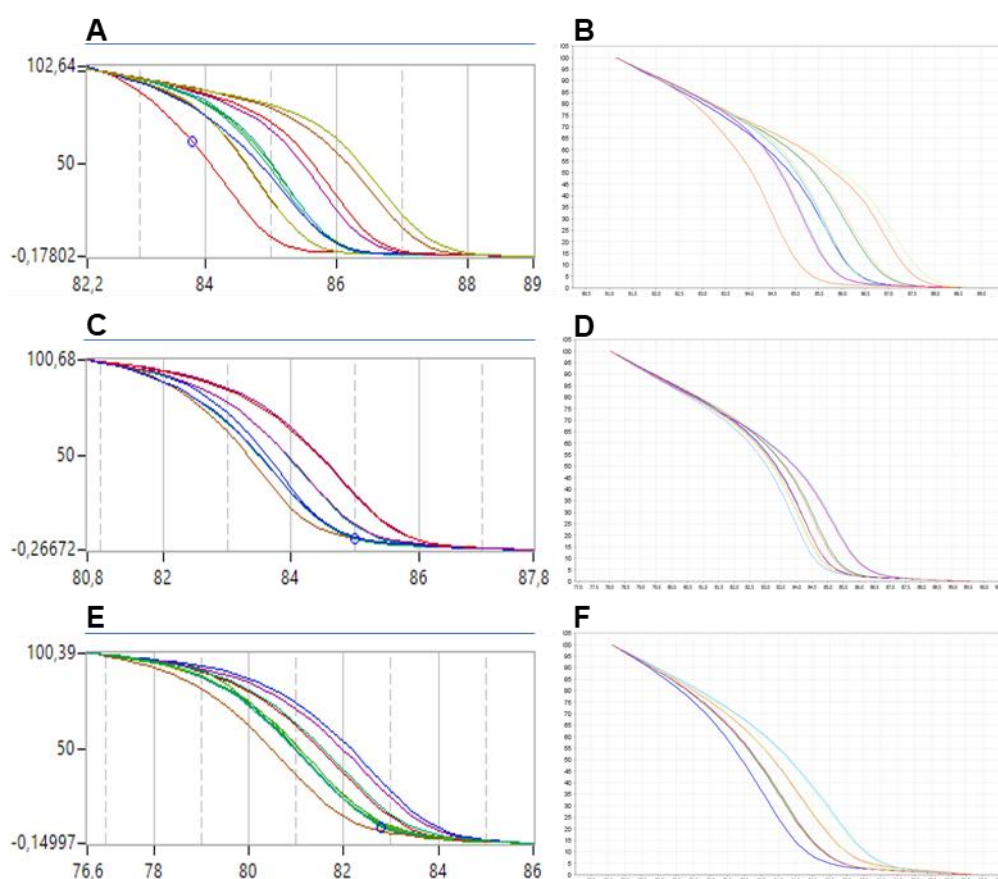


Figura 17 - Perfis de dissociação obtidos de cepas-referência em experimentos realizados em equipamentos e softwares diferentes. Testes paralelos foram realizados nos equipamentos PikoReal96 (Thermo Fisher Scientific) (A, C e E) ou StepOne (Life Technologies) (B, D e F) e analisados com os *softwares* PikoReal™ Software v2.1.158.545 ou High Resolution Melt Software v3.0.1, respectivamente. Os perfis foram obtidos da produção dos Amplicons 1 (A e B), 2 (C e D) e 3 (E e F).

Os valores de T_m determinados variaram em função da máquina utilizada, porém as diferenças entre os valores obtidos das diferentes espécies ou grupos de espécies se mantiveram capazes de serem discriminados com a mesma margem de variação (variações de pelo menos $0,25^{\circ}\text{C}$), quando comparadas para a mesma condição (mesmo equipamento). A Figura 18 mostra os valores de T_m obtidos nos experimentos realizados em paralelo.

4.6 Validação dos protocolos de identificação por HRM com cepas previamente caracterizadas

Um ensaio de HRM empregando o Amplicon 1 como alvo foi realizado em amostras de DNA genômico de outras cepas de *Leishmania*, cujas identificações segundo o código internacional padronizado pela OMS estão descritas na Tabela 11. Algumas dessas cepas representam isolados obtidos de diferentes regiões geográficas do Brasil. A identificação dessas cepas a partir dos perfis gerados pelo ensaio foi coincidente com os valores de T_m das cepas-referência utilizadas na padronização dos testes (Tabela 11). A eficiência de identificação, que variou entre 67,88 e 91,10%, é um parâmetro calculado pelo *software* de análise PikoReal96, com comparações entre amostras submetidas a testes e padrões, levando em considerações semelhanças entre valores de T_m e entre os perfis de dissociação. A correta identificação dessas cepas, pelas análises de dissociação em alta resolução, é descrita neste trabalho com o objetivo de validar o protocolo proposto.

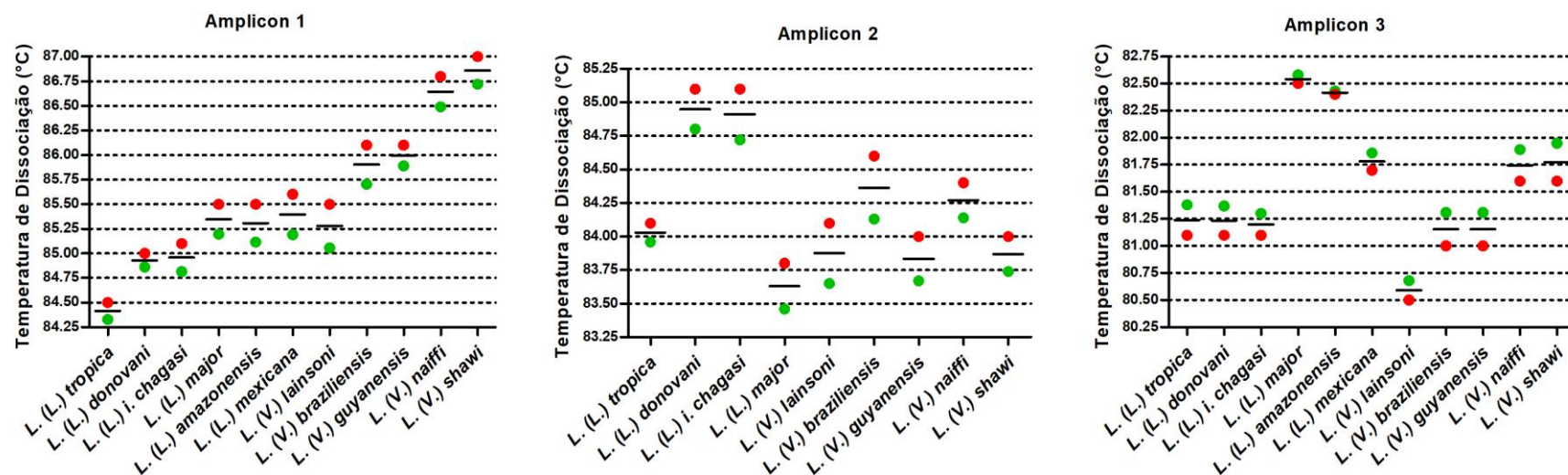


Figura 18 - Valores de Tm obtidos de cepas-referência em experimentos realizados em equipamentos e softwares diferentes. Testes paralelos foram realizados nos equipamentos PikoReal96 (Thermo Fisher Scientific) ou StepOne (Life Technologies) e analisados com os softwares PikoReal™ Software v2.1.158.545 ou High Resolution Melt Software v3.0.1, respectivamente. Os perfis foram obtidos na produção dos amplicons 1, 2 e 3. Dots verdes: PikoReal; Dots vermelhos: StepOne.

Tabela 11 – Eficiência de identificação por HRM utilizando o Amplicon 1 em isolados previamente caracterizados

Espécie / Cepa ID	Identificação	Eficiência (%)
<i>L. (L.) infantum chagasi</i> (MHOM/BR/74/M2682)	<i>inf</i>	67,88
<i>L. (L.) amazonensis</i> (MPHI/BR/99/M12275)	<i>ama</i>	83,35
<i>L. (V.) lainsoni</i> (IUBI/BR/91/M13469)	<i>lai</i>	73,72
<i>L. (V.) braziliensis</i> (MHOM/BR/2001/M19675)	<i>bra</i>	85,47
<i>L. (V.) braziliensis</i> (MHOM/BR/96/M115923)	<i>bra</i>	81,12
<i>L. (V.) guyanensis</i> (MHOM/BR/2001/M19869)	<i>guy</i>	78,73
<i>L. (V.) naiffi</i> (MDAS/BR/82/M6934)	<i>nai</i>	87,75
<i>L. (V.) shawi</i> (MHOM/BR/2001/M19670)	<i>sha</i>	91,1
<i>L. (V.) shawi</i> (MHOM/BR/2001/M19664)	<i>sha</i>	87,9
<i>L. (V.) shawi</i> (MHOM/BR/1990/M19703)	<i>sha</i>	88,1

Identificação dada pelo *software* às amostras de DNA de isolados com base na comparação de seus perfis de dissociação com os das cepas-referência utilizadas como padrão. (*inf*): *L. (L.) infantum chagasi*; (*ama*): *L. (L.) amazonensis*; (*lai*): *L. (V.) lainsoni*; (*bra*): *L. (V.) braziliensis*; (*guy*): *L. (V.) guyanensis*; (*nai*): *L. (V.) naiffi*; (*sha*): *L. (V.) shawi*.

4.7 Identificação de *Leishmania* em amostras clínicas e de campo, previamente testadas com outros alvos, obtidas do banco de DNA do Laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos

Amostras do banco de DNA do Laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos – IB-USP, previamente testadas por outras metodologias, foram submetidas a ensaios de HRM dos Amplicon 1 e 2.

Os resultados obtidos por HRM confirmam, em todos os casos, resultados obtidos anteriormente por sequenciamento do SSUrDNA ou por amplificação por PCR de *g6pd*. Essas metodologias, descritas por Uliana *et al.*³⁵ e por Castilho *et al.*⁵¹, respectivamente, permitem a discriminação de algumas espécies de *Leishmania*: o sequenciamento do SSUrDNA, revela polimorfismos que, entre as espécies circulantes do Brasil, são capazes de discriminar *L. (L.) amazonensis* de *L. (L.) infantum chagasi* e das espécies do subgênero *L. (Viannia)*; enquanto os ensaios de *g6pd*-PCR é capaz de identificar os subgêneros do parasita e discriminar *L. (V.) braziliensis* entre as *L. (Viannia) spp.*

A detecção e identificação de *L. (V.) braziliensis* foi possível em todas as amostras cujas origens eram diretamente pacientes humanos, ou isolados obtidos de lesões de pacientes. Essa espécie também foi detectada em amostra originada em um camundongo infectado experimentalmente e em amostras de infecções naturais de um cão e um flebotomíneo. *L. (L.) amazonensis* foi identificada como espécie presente nas amostras de dois camundongos experimentalmente infectados, como esperado; e *L. (L.) infantum chagasi* foi a espécie identificada em amostras de infecção natural de um cão e um flebotomíneo.

Todas as amostras tiveram os resultados obtidos por *hsp70*-HRM compatíveis com os obtidos por sequenciamento do SSUrDNA e/ou testes de *g6pd*-PCR (Tabela 12).

Tabela 12 – Identificação de *Leishmania* em amostras clínicas, de campo ou experimentais por ensaios de HRM

Fonte da amostra	Identificação por <i>hsp70</i> -HRM		Identificação prévia	
	Amplicon 1	Amplicon 2	Espécie	Método
Humano ^a	<i>bra</i>	<i>bra</i> ou <i>nai</i>	<i>L. (Viannia)</i> spp.	SSU + seq
Humano ^a	<i>bra</i>	<i>bra</i> ou <i>nai</i>	<i>L. (Viannia)</i> spp.	SSU + seq
Humano ^a	<i>bra</i>	<i>bra</i> ou <i>nai</i>	<i>L. (Viannia)</i> spp.	SSU + seq
Humano ^a	<i>bra</i>	<i>bra</i> ou <i>nai</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>g6pd</i> PCR
Humano ^b	<i>bra</i>	<i>bra</i> ou <i>nai</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>g6pd</i> PCR
Humano ^b	<i>bra</i>	<i>bra</i> ou <i>nai</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>g6pd</i> PCR
Humano ^b	<i>bra</i>	<i>bra</i> ou <i>nai</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>g6pd</i> PCR
Humano ^c	<i>bra</i>	<i>bra</i> ou <i>nai</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>g6pd</i> PCR
Humano ^d	<i>bra</i>	<i>bra</i> ou <i>nai</i>	<i>L. (Viannia)</i> spp.	SSU + seq
Cão ^a	<i>bra</i>	<i>bra</i> ou <i>nai</i>	<i>L. (Viannia)</i> spp.	SSU + seq
Cão ^a	<i>inf</i>	não detectado	<i>L. (L.) i. chagasi</i>	SSU + seq
Camundongo ^e	<i>ama</i>	não detectado	<i>L. (L.) amazonensis</i>	SSU + seq
Camundongo ^e	<i>ama</i>	não detectado	<i>L. (L.) amazonensis</i>	SSU + seq
Camundongo ^e	<i>bra</i>	<i>bra</i> ou <i>nai</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>g6pd</i> PCR
Flebotomíneo ^f	<i>inf</i>	não detectado	<i>L. (L.) i. chagasi</i>	SSU + seq
Flebotomíneo ^g	<i>bra</i>	<i>bra</i> ou <i>nai</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>g6pd</i> PCR

Comparação dos resultados obtidos por ensaios de HRM dos amplicons 1 e 2 com os previamente obtidos por sequenciamento do SSUrDNA³⁵ ou *g6pd*-PCR⁵¹. (a): amostras frescas de lesão desenvolvida em hamsters a partir de isolados humanos ou cães; (b): cultura isolada de paciente humano; (c): amostra fresca de lesão de paciente humano; (d) amostra parafinada de lesão de paciente humano; (e): amostras de lesões de camundongos experimentalmente infectados; (f): pool de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* naturalmente infectadas; e (g): pool de *Lu. (Nyssomyia) whitmani* naturalmente infectadas; (*inf*): *L. (L.) infantum chagasi*; (*ama*): *L. (L.) amazonensis*; (*bra*): *L. (V.) braziliensis*.

4.8 Identificação de *Leishmania* em amostras clínicas em estudo retrospectivo com amostras parafinadas de pacientes com suspeita de leishmaniose da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

Biópsias parafinadas realizadas entre 2005 e 2014 em pacientes da Clínica de Dermatologia da Santa Casa de São Paulo, com quadro clínico e histopatológico sugestivos de leishmaniose cutânea, cutâneo-mucosa ou mucosa, foram processadas com passos de remoção de parafina e purificação de DNA genômico, como descrito na seção 3.3.3 de Material e Métodos. Ensaios de *hsp70*-HRM e *hsp70C*-RFLP foram realizados após reação de pré-amplificação desse alvo. Outras informações como características das lesões, evidências da presença do agente por microscopia direta e perfis histopatológicos, resultados de testes sorológicos e de Montenegro, e evolução do tratamento foram registradas e estão apresentadas na tabela descritiva dessas análises (Tabela 13). Dos 19 pacientes estudados, 13 tiveram diagnóstico final positivo com base na análise conjunta de exames complementares (sorológicos e microscópicos/histológicos). As Tabelas 13 e 14 mostram os dados de resultados complementares prévios e os obtidos pelos ensaios de *hsp70*-HRM e *hsp70C*-RFLP.

Testes de PCR convencional para amplificação do SSUrDNA foram realizados com as todas as amostras, numa triagem preliminar de casos positivos (Tabela 14). Esse alvo não foi detectado em nenhuma das amostras em que o diagnóstico prévio não indicava leishmaniose tegumentar como causa da lesão. Entre as 14 amostras (14, sendo que o paciente identificado como VROF foi representado por duas amostras) de pacientes diagnosticados com leishmaniose, 8 tiveram esse alvo detectado (57,1%).

Dos 13 pacientes com confirmação diagnóstica, apenas 1 não teve a presença ou identificação do parasita confirmada pelos ensaios de *hsp70*-HRM

(paciente MST). Considerando o total de amostras testadas, esse ensaio detectou e identificou *Leishmania* em 92,6% dos casos diagnosticados previamente como positivos.

Tabela 13 – Exames complementares e dados de pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar tratados na Santa Casa de São Paulo

Pacientes	Diagnóstico	Origem (UF)	Tipo de lesão	Exames Complementares				Evolução	
				Microscopia		Imunologia		Tratamento	Cura
				MO	IHQ	MN	Sorologia		
IILA	+	MG	úlceras	+	nr	15 mm	nr	GLUC	#
MFG	+	PR	úlceras	+	+		+	GLUC	sim
CDS	+	SE	nodulos	-	nr	24 mm	+	GLUC	sim
VROF	+	BA	úlceras	+	nr	3 mm	nr	GLUC	sim
NRJ	+	BA	pápulas	+	-	48 mm	+	GLUC	sim
EPS	+	RN	úlceras	nr	+	nr	nr	GLUC	sim
MZSP	+	BA	pápulas	-	nr	nr	nr	GLUC	sim
GSP	+	BA	úlceras	+	nr	nr	nr	GLUC	#
ARR	+	BA	úlceras	+	nr	nr	+	Não	#
PGL	+	MG	pápulas	+	+	nr	nr	Não	#
MSM	+	AL	úlceras	-	nr	-	+	Não	sim
FG	+	MG	úlceras	nr	+	nr	+	GLUC	sim
MST	+	SP	úlceras	nr	+	nr	-	GLUC	sim
EFS	-	BA	úlceras	-	-	#	+	GLUC+ANFB	não
JCS	-	BA	úlceras	-	-	33 mm	nr	GLUC	sim
JGT	-	BA	úlceras	-	-	nr	nr	GLUC	#
MCP	-	MG	úlceras	-	-	#	+	Não	sim
MRMS	-	BA	úlceras	-	-	34 mm	+	Não	#
NP	-	SP	úlceras	-	-	-	-	#	#

Dados de identificação por iniciais de nomes dos pacientes seguidos de informações sobre o diagnóstico obtidos de formulários ambulatoriais: origem geográfica, características das lesões, exames complementares e evolução clínica dos casos. (UF): Unidade federativa; (MO): microscopia ótica; (IHQ): ensaio imunohistoquímico; (MN): reação intradérmica de Montenegro; (+): positivo; (-): negativo; (nr): procedimento não realizado; (#): informação ausente nos prontuários ou paciente sem retorno; (GLUC): Glucantime®; (ANFB): anfotericina B.

A identificação simultânea de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) i. chagasi* foi obtida em dois pacientes, sendo que em um deles a presença de cada uma das espécies do parasita foi observada em amostras distintas (paciente VROF), enquanto no outro o ensaio de *hsp70*-RFLP evidenciou a presença dessas espécies na mesma amostra (paciente EPS).

Tabela 14 – Ensaios de *hsp70*-HRM, *hsp70*-RFLP e SSUrDNA-PCR realizados em amostras de pacientes com diagnóstico prévio de leishmaniose tegumentar tratados na Santa Casa de São Paulo

Pacientes	SSUrDNA	<i>hsp70</i> -HRM			<i>hsp70</i> RFLP	Identificação
		Amplicon 1	Amplicon 2	Amplicon 3		
IILA	+	<i>ama</i>	-	<i>ama</i>	<i>ama</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>
MFG	-	<i>ama-lai</i>	-	nr	<i>ama</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>
CDS	+	<i>ama</i>	-	<i>ama</i>	<i>ama</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>
VROF	+	<i>inf</i>	-	<i>inf</i>	<i>inf</i>	<i>L. (L.) i. chagasi</i>
	+	<i>ama</i>	-	nr	<i>ama</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>
NRJ	-	<i>ama</i>	-	nr	<i>ama</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>
EPS	+	<i>ama</i>	-	<i>ama</i>	<i>ama-inf</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) i. chagasi</i>
MZSP	+	<i>ama</i>	-	<i>ama</i>	<i>ama</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>
GSP	+	<i>inf</i>	-	nr	<i>inf</i>	<i>L. (L.) i. chagasi</i>
ARR	-	<i>bra-guy</i>	<i>bra-nai</i>	nr	nr	<i>L. (V.) braziliensis</i>
PGL	-	<i>bra-guy</i>	<i>bra-nai</i>	nr	nr	<i>L. (V.) braziliensis</i>
MSM	-	<i>guy</i>	<i>guy-lai-sha</i>	nr	nr	<i>L. (V.) guyanensis</i>
FG	+	<i>bra-guy</i>	<i>bra-nai</i>	<i>bra</i>	nr	<i>L. (V.) braziliensis</i>
MST	-	-	-	-	-	-

Dados de identificação por iniciais de nomes dos pacientes seguidos dos resultados obtidos para cada ensaio. (+): positivo; (-): negativo; (nr): procedimento não realizado; (*inf*): *L. (L.) infantum chagasi*; (*ama*): *L. (L.) amazonensis*; (*lai*): *L. (V.) lainsoni*; (*bra*): *L. (V.) braziliensis*; (*guy*): *L. (V.) guyanensis*; (*nai*): *L. (V.) naiffi*; (*sha*): *L. (V.) shawi*.

L. (L.) amazonensis foi a espécie encontrada na maioria das amostras. Foi detectada em 7 das 13 amostras obtidas de pacientes com diagnóstico positivo. Os sinais clínicos nesses pacientes eram compatíveis com o diagnóstico de leishmaniose tegumentar. As origens geográficas desses pacientes coincidem com áreas endêmicas dessa espécie de parasita (Região Nordeste, MG e PR), segundo dados epidemiológicos do Ministério da Saúde⁹³. A cura das lesões foi observada após o tratamento com antimoniato de meglumina (Glucantime®) em todos os casos onde o seguimento do paciente foi realizado.

L. (V.) braziliensis foi detectada em amostras de 3 dos 13 pacientes com diagnóstico positivo. Esses pacientes, de origens geográficas coincidentes às áreas onde essa espécie de parasita é endêmica⁹³, apresentaram sinais clínicos compatíveis com leishmaniose tegumentar e um deles (paciente FG) teve a cura da lesão observada após o tratamento com Glucantime®.

L. (L.) infantum chagasi foi detectada em 3 dos 13 pacientes com diagnóstico positivo, de origens geográficas compatíveis com as áreas onde essa espécie de parasita é endêmica (BA e RN)⁹³. A cura das lesões foi observada nos pacientes com seguimento concluído após o tratamento com Glucantime®.

A espécie *L. (V.) guyanensis* foi detectada em um dos 13 casos de diagnóstico positivo (paciente MSM). O paciente apresentava lesão compatível com leishmaniose cuja cura espontânea foi observada sem tratamento quimioterápico.

Em algumas amostras, o ensaio de dissociação do Amplicon 3 não foi realizado por ter sido o último alvo a ser projetado nesse trabalho. Algumas amostras foram totalmente utilizadas nos testes com os Amplicons 1 e 2 e nos ensaios de RFLP antes mesmo da padronização dos ensaios com o terceiro amplicon.

4.9 Determinação de perfis de dissociação de isolados de *L. (Viannia)* previamente caracterizados como híbridos

Sete isolados de pacientes da região amazônica (Santarém/PA), diagnosticados com leishmaniose tegumentar americana, foram previamente tipados por sequenciamento e ensaios de RFLP do gene *hsp70*, além de análises de perfis eletroforéticos de algumas isoenzimas caracterizados por Jennings *et al.*⁹⁴. Esses resultados sugeriram que o genoma desses parasitas é composto por haplótipos híbridos, com perfis mistos de *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) shawi*, e estão sumarizados na Tabela 15. Em função dessas características, foram realizados ensaios de HRM

com o objetivo de se comparar o perfil de dissociação dos nossos alvos nesses isolados com os de cepas tidas como referência.

Tabela 15 – Perfis isoenzimáticos e de *hsp70*-RFLP de cepas referência e isolados de pacientes de Santarém-PA

Amostras		perfil de isoenzimas						<i>hsp70</i> -RFLP
		6PGD	G6PD	PGM	MPI	ASAT	ALAT	
Cepas referência	<i>L. (V.) guyanensis</i>	2	2	3	6	2	2	<i>L. (V.) guyanensis</i>
	<i>L. (V.) shawi</i>	5	1	4	7	3	2	<i>L. (V.) shawi</i>
Isolados	M15983	2,3,5	2	4	6	5	2	<i>L. (V.) shawi</i>
	M15984	2,3,5	2	3	6	5	2	<i>L. (V.) shawi</i>
	M15987	2,3,5	2	3	6	5	2	<i>L. (V.) guyanensis</i> / <i>L. (V.) shawi</i>
	M15988	2,3,5	2	3	6	5	2	<i>L. (V.) shawi</i>
	M19672	2,3,5	2	4	6	5	2	<i>L. (V.) guyanensis</i> / <i>L. (V.) shawi</i>
	M19676	2,3,5	2	4	6	5	2	<i>L. (V.) guyanensis</i> / <i>L. (V.) shawi</i>
	M19697	2,3,5	2	4	6	5	2	<i>L. (V.) shawi</i>

A análise numérica do perfil isoenzimático dessas amostras foi realizada como descrito por Jennings *et al.*⁹⁴. Os perfis de *hsp70*-RFLP foram determinados como descrito por Graça *et al.*⁵⁴ por Stocco⁹⁵ em tese de doutoramento.

O DNA genômico (50 ng) extraído de clones desses isolados foi utilizado como molde. Os perfis de dissociação do Amplicon 1 obtidos dos isolados M15983, M15984 e M15988 se apresentaram similares ao perfil de *L. (V.) shawi*, enquanto os isolados M15987 e M19672 apresentaram um perfil distinto de todos os outros obtidos das cepas-referência utilizadas como padrão no teste. Não houve amplificação específica desse alvo nos testes que utilizaram o DNA dos isolados M19676 e M19697 como molde. O Amplicon 2 foi produzido em todos os isolados e apresentaram perfis similares aos de *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) shawi* (Figura 19).

As T_m determinadas nos ensaios com o Amplicon 1, de maneira semelhante aos perfis de dissociação, segregaram as amostras em dois grupos, um com valores semelhantes à T_m registrada para *L. (V.) shawi* (isolados M15983, M15984 e M15988) e outro com valor distinto de todas as espécies utilizadas como referência no teste.

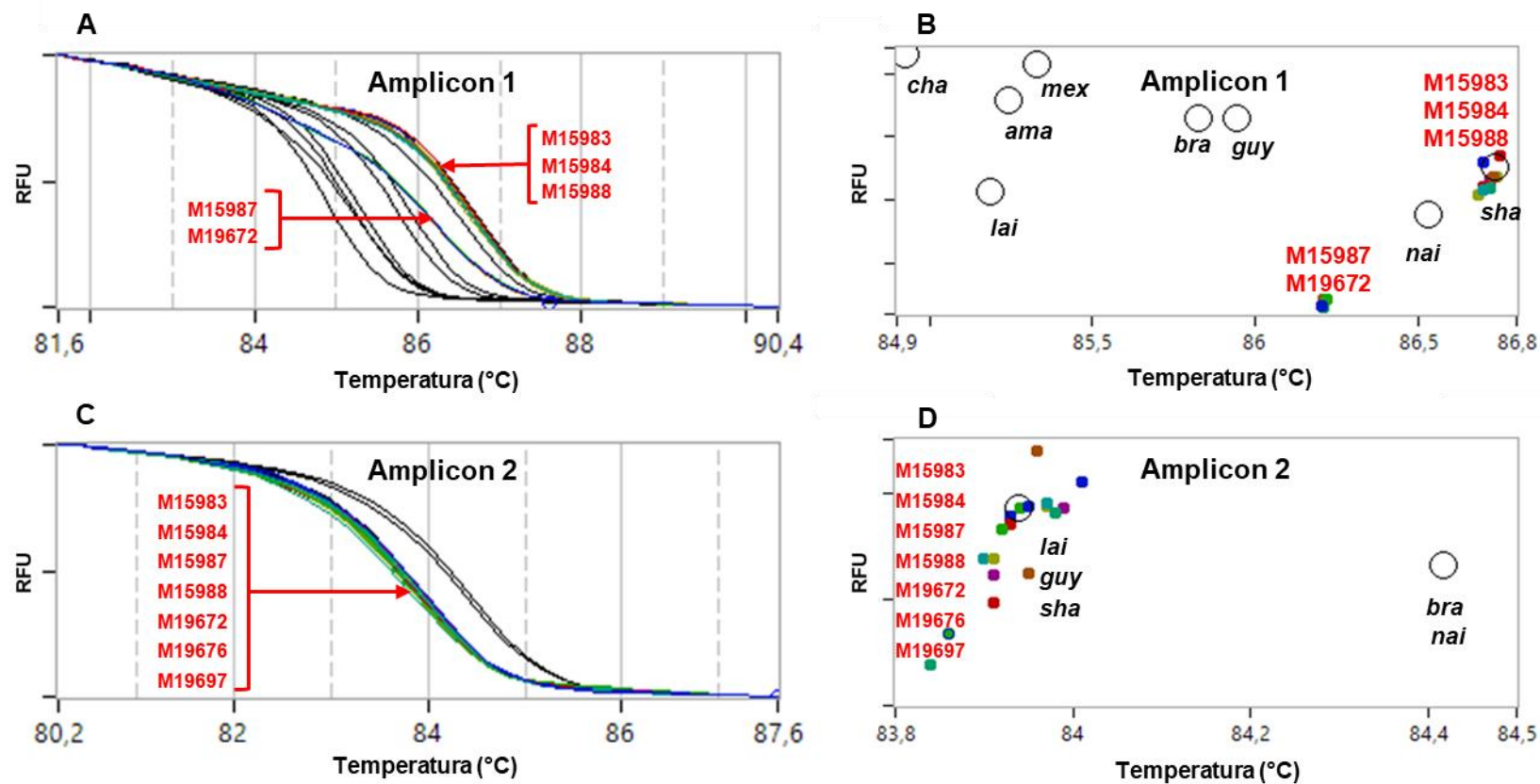


Figura 19 -

Análise de HRM de isolados previamente caracterizados como híbridos *L. (V.) guyanensis* / *L. (V.) shawi*. Curvas de dissociação (A e C) e gráficos de dispersão individual das amostras (B e D). Os círculos brancos indicam a posição das cepas utilizadas como referência nos testes (*cha*): *L. (L.) infantum chagasi*, (*ama*): *L. (L.) amazonensis*, (*mex*): *L. (L.) mexicana*, (*lai*): *L. (V.) lainsoni*, (*bra*): *L. (V.) braziliensis*, (*guy*): *L. (V.) guyanensis*, (*nai*): *L. (V.) naiffi* e (*sha*): *L. (V.) shawi*. Os círculos coloridos indicam a posição dos isolados híbridos.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Dada a importância da detecção e discriminação específica dos agentes causadores das leishmanioses em diversos contextos, o estabelecimento de protocolos para esse fim torna-se extremamente útil. Sob a ótica clínica, a detecção e correta identificação das espécies de *Leishmania* envolvidas em infecções pode balizar estratégias de tratamento com protocolos espécie-específicos para otimizar a eficácia terapêutica. Protocolos de tratamento recomendados pela OMS⁹, desenhados com base em extensos estudos clínicos, indicam a administração de uma variada lista de drogas que inclui antimoniais pentavalentes, anfotericina B, paromomicina, pentamidina, miltefosina e azoles. As diferentes formas clínicas e as diferentes espécies envolvidas nas infecções humanas, na maioria das vezes determina o protocolo terapêutico de utilização dessas drogas, com diferenças nas doses e na combinação entre elas⁹. Além disso, informações sobre a identidade da espécie envolvida em infecções cutâneas permitem melhores prognósticos de evolução para formas mucocutâneas, assim como tempo de cura e respostas às terapias, fatores críticos em pacientes imunocomprometidos ou com comorbidades, para os quais os custos e benefícios à saúde devem ser considerados nos planos de tratamento⁹⁶. Da mesma forma, a identificação dos patógenos responsáveis pela leishmaniose visceral em regiões onde mais de uma espécie é endêmica, ou mesmo em pacientes imunocomprometidos, cujas infecções primariamente tegumentares podem seguir um curso de visceralização atípica, torna-se relevante para o delineamento do protocolo terapêutico²⁹.

A utilização de DNA como alvo com fins diagnósticos, principalmente em protocolos baseados em PCR, muitas vezes sofre restrições quando os alvos apresentam polimorfismos nem sempre detectáveis ou quando a análise dos resultados não pode ser conduzida de forma simples e direta, ou seja, seu poder discriminatório depende da associação de procedimentos como o uso combinado de

outros alvos em reações de PCR multiplex, clivagem dos produtos de PCR com enzimas de restrição (RFLP) ou o sequenciamento direto do produto de amplificação. A necessidade de manipulação dos produtos de PCR nesses casos também é um fator que contribui para a não utilização dessas estratégias como padrão-ouro: a análise e interpretação de ensaios pós-PCR como sequenciamento, digestões enzimáticas ou fracionamento eletroforético, depende de profissional treinado e experiente, além de gerar um potencial risco de contaminação de laboratórios com amplicons que podem comprometer a rotina laboratorial com falsos positivos.

Uma maneira de explorar polimorfismos em sequências de DNA é a determinação indireta do %GC de produtos de PCR específicos, com a determinação de suas temperaturas de dissociação (T_m) e perfis cinéticos de dissociação com os dados fornecidos em uma curva progressiva de desnaturação. Os valores de T_m e perfis cinéticos dos amplicons são diretamente relacionados com a quantidade de ligações, por pontes de hidrogênio, entre as bases nitrogenadas que compõem a estrutura dos amplicons, e são, por isso, características que podem ser exploradas na discriminação de moléculas distintas. A metodologia nomeada como HRM, conceitualmente baseada nesse princípio, tem como principais vantagens as características ligadas à sua relativa simplicidade técnica e praticidade. Na utilização dessa metodologia, as análises dos parâmetros discriminatórios são realizadas em poucas horas por um *software* do próprio equipamento onde as reações de amplificação por PCR acontecem e, portanto, sem um custo adicional relacionado a metodologias acopladas. Por se tratar de uma variação da técnica de PCR em tempo real, os ensaios de HRM podem, em uma única reação detectar, quantificar e identificar alvos de DNA em amostras biológicas e, por não depender de manipulação direta dos amplicons, não compromete o ambiente de análise com riscos de contaminação. Além disso, a análise feita em *softwares* calibrados com parâmetros

corretamente estabelecidos possibilita a automatização e objetividade dos resultados sem que seja necessária sua interpretação por um analista altamente qualificado.

Apesar de serem ainda escassas na literatura, as análises de HRM têm sido aplicadas na identificação de agentes infecciosos e recentemente empregadas em protocolos de identificação de *Leishmania* spp. com resultados que variam quanto à abordagem e à capacidade discriminatória.

O primeiro trabalho que utiliza essa abordagem descreveu, em meados dos anos 2000, a possibilidade de discriminação de espécies de *Leishmania* que acometem o chamado Velho Mundo, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) major*, explorando polimorfismos do kDNA⁹⁷. Na última década a técnica foi testada com a utilização de outros alvos, em especial com aqueles que representam genes e regiões do DNA já descritos como informativos por outras técnicas. O emprego do kDNA possibilitou a discriminação dos subgêneros *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)* e as espécies *L. (L.) amazonensis* de *L. (L.) infantum* em cepas isoladas e amostras clínicas ou de campo^{98, 99}. Variações nucleotídicas no 7SL RNA, gene que codifica um RNA componente de um complexo ribonucleoprotéico de translocação de proteínas, foram capazes de discriminar *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major* e espécies que causam leishmaniose visceral em amostras clínicas¹⁰⁰; esse mesmo alvo foi investigado na incriminação do roedor *Ctenodactylus gundi* como um potencial hospedeiro de *L. (L.) tropica* na Tunísia¹⁰¹. Perfis dissociação foram obtidos com o emprego do gene que codifica a proteína acetilada de superfície tipo B (*haspb*) e permitiram a discriminação cepas de *L. (L.) donovani* de diferentes regiões do leste africano⁵⁸. Utilizando como alvo sequências do espaçador interno transcrito do RNA (ITS-1), análises de HRM incriminaram a espécie *Phlebotomus sergenti* como vetor natural de *L. (L.) tropica* no sudoeste do Irã e permitiram a discriminação entre *L. (L.) tropica* e *L. (L.) infantum* na Turquia^{102, 103}; polimorfismos encontrados nesse mesmo alvo foram capazes de discriminar *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) aethiopica* e *L.*

(*L.*) *infantum* em amostras do Oriente Médio, Ásia, África e Europa¹⁰⁴, inclusive apontando cães como possíveis reservatórios de *L. (L.) tropica* e *L. (L.) major* em Israel^{105, 106}. Valores de Tm obtidos de regiões de dois alvos diferentes, ITS-1 rRNA e *hsp70*, analisados combinadamente, permitiram a discriminação de seis espécies americanas de *Leishmania*: *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis*¹⁰⁷.

Também utilizando a combinação de alvos, dessa vez o gene que codifica a manose fosfato isomerase (*mpi*) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGD), ensaios de HRM discriminaram as cinco principais espécies do subgênero *L. (Viannia)* responsáveis por infecções na América do Sul: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) lainsoni*¹⁰⁸. Em um projeto realizado paralelamente a este, nosso grupo padronizou o emprego do alvo *aap3* (*amino acid permease 3*) que, ao ter analisados perfis e Tm gerados por três segmentos diferentes, foi capaz de discriminar as principais espécies relacionadas às leishmanioses na África, Eurásia e Américas¹⁰⁹.

A principal proposta deste trabalho foi descrever um protocolo utilizando a técnica de HRM que fosse capaz de identificar, utilizando apenas um alvo, as principais espécies causadoras das leishmanioses. Para isso, foram exploradas as sequências nucleotídicas do gene que codifica a proteína HSP70 de *Leishmania* spp., na busca de polimorfismos com potencial de discriminar o maior número de espécies de *Leishmania*.

Alinhamentos de sequências disponíveis no GenBank de um fragmento de 380 pb desse gene revelou a existência de pelo menos 54 pontos polimórficos, determinando uma identidade de 85,8% entre as sequências das 12 cepas-referência analisadas (Figura 1). Regiões conservadas foram consideradas para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores que delimitaram fragmentos que representam o mesmo *locus* nas espécies estudadas. O balanço entre o grau de conservação e a existência

de polimorfismos ao longo dessas sequências foram considerados indícios de que comportamentos termocinéticos distintos poderiam ser esperados se esses fragmentos de DNA fossem testados experimentalmente.

Um fragmento interno ao primeiro, foi amplificado utilizando como molde o DNA de cepas-referência disponíveis no laboratório, de espécies correspondentes às analisadas *in silico* a partir de sequências obtidas do GenBank. A identidade entre as sequências disponíveis e as obtidas no laboratório, de espécies correspondentes, foi de 100%. Esse fragmento, de 234 pb, é descrito como um alvo altamente informativo para a identificação de *Leishmania* spp. em um protocolo de RFLP que, em ensaios independentes, utilizam três enzimas de restrição que geram perfis eletroforéticos capazes de discriminar, em conjunto, pelo menos sete espécies de *Leishmania* que circulam no Brasil⁵⁴. Além desse trabalho, outros utilizaram o potencial informativo do gene *hsp70* em protocolos de identificação e/ou estudos filogenéticos^{52, 53, 55, 56, 71, 73, 74}. A descrição do potencial discriminatório do *hsp70* nesses estudos balizou a escolha desse alvo nas tentativas de aplicação da técnica de HRM.

Após detalhadas análises dessas sequências, em que temperaturas de dissociação teóricas foram simuladas para diferentes fragmentos, três regiões foram escolhidas por conterem polimorfismos potencialmente relevantes para discriminar as espécies analisadas (Figuras 2, 3 e 4). A escolha foi feita inicialmente com base nos achados obtidos *in silico*, considerando a quantidade de nucleotídeos polimórficos e as diferenças entre as temperaturas teóricas de dissociação (Tabelas 5, 6 e 7). Observa-se que não há uma correlação direta entre as diferenças de Tm e quantidade de nucleotídeos polimórficos, resultado de um efeito compensatório no %GC das trocas nucleotídicas entre as espécies.

Esses parâmetros foram considerados na escolha dos fragmentos durante as análises *in silico*. Todas as variações simuladas de T_m , quando diferentes de zero, foram maiores ou iguais a 0,3°C, valor superior ao limite de precisão do equipamento que determina experimentalmente a T_m utilizando o protocolo padronizado neste trabalho, que é de 0,2°C. Valores nulos indicariam, em tese, a impossibilidade de discriminação entre duas espécies.

A simulação dos valores de T_m para cada espécie permitiu a visualização da possibilidade de agrupamento de espécies, de formas diferentes entre os três fragmentos delimitados, que analisados em conjunto poderiam discriminar cada uma delas e, como esperado, pudemos observar uma correlação positiva entre valores de T_m e %GC para os três amplicons (Figura 6, Tabela 3).

A variabilidade intraespecífica dos fragmentos nomeados como Amplicon 1 e Amplicon 2 foi avaliada em 186 sequências de *hsp70* disponíveis no GenBank de *L. (L.) tropica*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (L.) major*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (M.) martiniquensis* e *L. siamensis* (Tabela S1 do Anexo A)⁹⁰. Todas as sequências que incluem as regiões delimitadas para esses amplicons foram alinhadas e a identidade entre as sequências e seus valores teóricos de T_m foram estimados. Os bancos de dados de DNA contêm sequências obtidas muitas vezes por sequenciamento parcial de genes, amplificados *in vitro* por PCR ou RT-PCR, e podem estar sujeitos a erros inerentes à metodologia empregada, como a incorporação inexata de nucleotídeos pela DNA polimerase, trocas nucleotídicas induzidas por estrutura do DNA molde, recombinação induzida por PCR ou danos no DNA durante os ciclos térmicos de amplificação¹¹⁰. No entanto, se pudermos assumir que as diferenças encontradas entre os nucleotídeos são realmente polimorfismos e não erros inerentes aos métodos de amplificação, podemos verificar que as

diferenças entre T_m teóricas entre as mesmas espécies apresentam um mesmo padrão. Das 186 cepas analisadas, apenas duas cepas de *L. (L.) infantum* (MCAN/IR/96/LON-49 e LEM75/zymodeme1) tiveram as T_m calculadas com diferença maior que 0,3°C quando comparadas com as demais cepas da mesma espécie.

Por outro lado, polimorfismos no gene *hsp70* têm sido descritos em diferentes cepas da mesma espécie. Cepas de *L. (L.) amazonensis* e algumas espécies do subgênero *L. (Viannia)* apresentaram alelos variantes desse gene em ensaios de RFLP e sequenciamento direto, resultados que devem ser considerados no momento da identificação de *Leishmania* sp. por essas estratégias⁷⁵. Utilizando sequências depositadas em banco de dados, foram realizados testes *in silico* de identificação, com a determinação teórica das T_m de hipotéticos amplicons 1, 2 e 3 nas cepas descritas como polimórficas e os valores simulados de T_m para cada uma dessas cepas foram similares aos das cepas-referência das espécies correspondentes (resultados não apresentados nessa tese). Essa análise sugere que os ensaios de HRM com o DNA dessas amostras, na prática, poderiam identificar corretamente as espécies, mesmo que outros ensaios utilizando o mesmo alvo mostrem a existência de variantes alélicas do gene *hsp70* em uma mesma espécie.

Os amplicons gerados nos testes de padronização foram visualizados em gel de agarose para verificação de especificidade. Observa-se, nas eletroforeses desses produtos, bandas únicas com tamanho esperado na presença de DNA de *Leishmania* e ausência de amplificação a partir de DNA humano (Figura 7). Esse passo experimental foi dado no sentido de certificar que os produtos submetidos às análises seriam referentes exclusivamente ao parasita.

Os resultados experimentais, como esperado, reproduziram quase totalmente os perfis de identificação simulados nas etapas de análise *in silico*. Apesar de se notar diferenças entre as T_m determinadas em uma ou outra situação, a maioria das

espécies, quando testadas com quantidades iguais de DNA, puderam ser discriminadas com resolução similar à de quando submetidas às análises *in silico* (Figuras 6 e 8).

Quando se observa o panorama formado pelos valores de T_m e perfis de dissociação obtidos experimentalmente partindo de quantidades iguais de DNA e representado nas figuras 8 e 9, podemos extrair as seguintes informações: o Amplicon 1 segrega as espécies que causam leishmaniose cutânea daquelas que causam leishmaniose visceral; as espécies que causam a forma tegumentar podem ser discriminadas, com exceção de *L. (L.) amazonensis* de *L. (L.) mexicana* e *L. (V.) naiffi* de *L. (V.) shawi*; Os perfis determinados pela análise do Amplicon 2 agrupam as espécies que causam leishmaniose visceral discriminando-as das outras, que por sua vez se agrupam em três grupos diferentes as espécies que causam a forma tegumentar, com exceção de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana*, que não são detectáveis pela amplificação desse amplicon; O Amplicon 3 foi capaz de segregar as espécies em quatro grupos distintos sem determinar para cada grupo as características clínicas que elas desenvolvem em pacientes, porém com resolução para discriminar espécies que não puderam ser distintas com a utilização dos amplicons 1 e 2.

O parâmetro C_q (ciclo de quantificação) em uma análise de PCR em tempo real, define o ciclo em que a curva de amplificação tem sua curvatura máxima, e pode ser empregado para quantificar comparativamente as amostras, desde que elas sejam normalizadas por algum outro parâmetro. No caso dos testes de especificidade, todas as amostras foram normalizadas quando se utilizou a mesma quantidade em massa de DNA molde (50 ng por reação). Pode-se esperar que quanto maior a complementaridade dos oligonucleotídeos iniciadores com seu DNA alvo, maior é a eficiência de ligação entre eles e que bases não complementares dentro da região de ligação podem comprometer essa eficiência. Na prática,

iniciadores perfeitamente complementares ao alvo têm uma performance otimizada nas reações de PCR, que determinam valores de Cq mais precoces com relação a iniciadores com uma ou mais bases não complementares ao alvo. De fato, quando os primeiros experimentos foram realizados para a escolha dos amplicons, PCRs convencionais foram realizadas para verificação da especificidade. As reações de amplificação do Amplicon 1 produziram bandas de intensidades semelhantes nas PCR convencionais e em tempo real, para todas as espécies testadas, sem discrepância significativa entre os valores de Cq obtidos, o que pode ser relacionado a uma eficiência otimizada das reações resultante de alta complementariedade dos iniciadores ao DNA alvo. O mesmo foi observado nas reações de amplificação do Amplicon 3. Em amplificações por PCR convencional do Amplicon 2, desenhado a princípio para discriminar *L. (Viannia)* spp., a ausência de bandas foi observada em todas as *L. (Leishmania)*, o que pode ser observado na figura S2 do artigo anexado (Anexo A). As PCR convencionais foram realizadas em 30 ciclos, que foram insuficientes para gerar produtos visíveis em gel de agarose quando amostras de DNA de *L. (Leishmania)* spp. foram utilizadas como molde. Por outro lado, para essas mesmas amostras, as reações de PCR em tempo real, que foram realizadas em 40 ciclos, geraram produtos visíveis tanto em gel de agarose, quanto em representações gráficas obtidas por *software* porém com valores de Cq tardios e bandas eletroforéticas menos intensas com relação aos obtidos para as espécies do subgênero *L. (Viannia)*, exceto para os obtidos para *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana*, nos quais a completa ausência de produto foi observada (Figuras 7 e 10; Tabela 8).

Os valores de Cq obtidos nos testes com o Amplicon 2 em amostras de DNA de *L. (Viannia)* spp. acontecem pelo menos 5 ordens de grandeza mais eficientemente do que em amostras de DNA de *L. (Leishmania)* spp.. Esses dados sugerem que análises dos valores de Cq, feitas em conjunto em testes com os 3

amplicons, podem discriminar esses dois subgêneros. Valores de Cq já foram utilizados como parâmetro de identificação de espécies de *Leishmania* em outro trabalho, em que *L. (L.) amazonensis* pôde ser discriminada de *L. (L.) infantum* com base na diferença entre o número de cópias de minicírculos de kDNA entre essas espécies. Os nossos resultados apontam para a possibilidade de utilizar valores de Cq como um indicador do subgênero ao qual um parasita pertence, podendo, por exemplo, identificar *L. (L.) amazonensis* em lesões tegumentares, excluindo o diagnóstico de infecção por espécies do subgênero *L. (Viannia)* em regiões onde essas espécies são endêmicas.

Apesar de ter gerado valores distintos de Tm para uma mesma amostra, a utilização de diferentes marcas de termocicladores produziu resultados que asseguram que o protocolo descrito nesta tese pode ser aplicado a qualquer aparelho, desde que controles internos, ou seja, DNAs de cepas-referência, sejam invariavelmente utilizados em todo experimento de identificação.

Dados obtidos com diluições seriadas contendo quantidades de DNA correspondentes a $5,0 \times 10^5$ a 0,5 parasita mostraram que a quantidade inicial de DNA molde submetido aos testes de HRM pode interferir na precisão da determinação de Tm (Figura 11). Esses testes, nas análises dos Amplicons 1 e 3, indicam que as variações de Tm em diluições de DNA da mesma espécie podem se sobrepor a valores obtidos para outras espécies. As variações observadas no teste com o Amplicon 2 não foram suficientes para sobrepor os perfis formados nos testes de padronização. Alguns autores não encontraram evidências de que as quantidades iniciais de DNA molde podem interferir na determinação de valores de Tm^{107, 111}, porém os testes realizados neste trabalho mostram claramente uma variação nesses valores que podem, em algumas situações, gerar resultados imprecisos. No entanto, esses resultados podem ser equacionados com a análise conjunta dos 3 amplicons projetados. O recente trabalho que explorou polimorfismos do gene *aap3*, realizado

por nosso grupo, mostrou que também para esse alvo, observa-se a influência da quantidade inicial de DNA molde¹⁰⁹. As observações dessas evidências estão relacionadas à maneira com que as análises são realizadas, uma vez que os equipamentos podem ser ajustados para captar os dados gerados em diferentes intervalos de temperatura e os *softwares* têm parâmetros que devem ser ajustados corretamente para detectar precisamente as variações nas determinações de T_m .

Os testes com diluições seriadas de DNA genômico serviram também para determinar a sensibilidade dos testes. A síntese de Amplicons 1 e 2 foi detectada com 50 fg de DNA genômico utilizados como molde, quantidade equivalente a aproximadamente 0,5 parasita, em todas as espécies testadas. O limite de detecção de síntese do Amplicon 3 foi a mesma nos testes com DNA de *L. (Leishmania) spp.*, mas não foi detectada amplificação específica nos pontos de diluição onde menos de 500 pg de DNA genômico de *L. (Viannia) spp.* foram utilizados como molde. Essa diferença nos limites de detecção está provavelmente ligada à especificidade dos iniciadores e pode, como discutido acima, servir de parâmetro de identificação de subgêneros se analisada em conjunto com dados dos outros dois amplicons.

Reações de PCR em tempo real, em função de suas características, são uma ferramenta precisa de quantificação de moléculas de DNA em uma amostra. Neste trabalho foram realizados ensaios que utilizaram curvas padrão produzidas com plasmídeos recombinantes contendo o Amplicon 1 de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) lainsoni* para verificar a possibilidade de uma abordagem quantitativa junto à proposta qualitativa do protocolo proposto de diagnóstico. O Amplicon 1 foi escolhido por ser o ensaio em que os iniciadores parecem se ligar com eficiência semelhante ao DNA de todas as espécies. O limite de detecção foi de 10 cópias desse alvo com coeficientes de correlação linear de 0,99 e eficiências variando entre 92,37 a 97,23%. Pontos da curva equivalentes a 1 cópia dos alvos não foram detectados. Considerando que *hsp70* é um gene

encontrado em cópias dispostas em tandem no genoma de *Leishmania* spp, em número variando entre 5 e 10^{68} , podemos assumir com esses resultados que a detecção e quantificação desse alvo seria possível em amostras contendo pelo menos um parasita.

A possibilidade de detecção, identificação e quantificação de parasitas em uma dada amostra pode fornecer dados interessantes para o delineamento e acompanhamento de protocolos terapêuticos e para estudos que abordam diversas óticas. O protocolo aqui proposto pode ser aplicado a amostras obtidas de infecções, já que a diluição do DNA do parasita no DNA do hospedeiro não prejudicou a correta identificação do parasita, pelo menos nos testes realizados com diluições de até 100 vezes (Tabela 9). O trabalho paralelo a este, que utiliza o gene *aap3* como alvo, mostra que os valores de T_m obtidos para as diferentes espécies não variam na presença ou ausência de DNA humano em diluições que correspondem à presença de 1 parasita em um total de 25 ng de DNA do hospedeiro¹⁰⁹.

Uma PCR convencional que utiliza oligonucleotídeos iniciadores posicionados externamente aos alvos que servem como molde para produção dos Amplicons 1, 2 e 3, foi projetada com o objetivo de enriquecer amostras com os alvos de identificação e, assim, aumentar tanto a sensibilidade quanto a especificidade dos testes. De fato, essa etapa de pré-amplificação do alvo permitiu o aumento de 10 vezes na sensibilidade nos testes de *hsp70*-HRM ou seja, a presença de 50 fg de DNA genômico de *Leishmania*, quantidade equivalente a menos de um parasita, foi detectável. Considerando que a determinação de padrões específicos de análise por HRM é totalmente dependente da produção de amplicons, essa etapa tem relevância na aplicação da técnica em amostras clínicas, em que nem sempre a carga parasitária é detectável por um único ensaio de amplificação. A utilização de estratégias de *nested* ou *semi-nested* PCR é descrita como um meio relativamente simples que aumenta tanto sensibilidade quanto especificidade de detecção de

Leishmania em amostras clínicas ou de campo^{42, 51} e é uma opção que já é empregada como estratégia de aumento de sensibilidade em testes de HRM¹¹².

Infecções mistas, com mais de uma espécie de *Leishmania*, ou até mesmo com tripanossomatídeos de outros gêneros, parasitando um mesmo hospedeiro, apesar de raras, têm sido descritas na literatura. Silveira *et al.*¹¹³ descrevem pela primeira vez, em 1984, uma infecção mista por *L. mexicana amazonensis* (nomenclatura empregada pelo autor) e *L. braziliensis*, em paciente da região amazônica, com a identificação dessas espécies confirmada por infecções experimentais em hamsters e flebotomíneos com isolados de lesões distintas. Em 1986, Oliveira-Neto *et al.*¹¹⁴, utilizando análises de perfis eletroforéticos de isoenzimas e anticorpos monoclonais, identificaram *L. donovani* e *L. braziliensis braziliensis* (nomenclatura empregada pelo autor) em amostras de medula óssea e tegumento, respectivamente, de um mesmo paciente, residente em área do Rio de Janeiro com sobreposição de incidência de leishmaniose tegumentar e visceral. Martinez *et al.*¹¹⁵, em 2002, descreveu o primeiro caso de detecção de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* em uma mesma lesão em um paciente boliviana, utilizando comparações de perfis eletroforéticos de oito isoenzimas. Recentemente um paciente árabe, portador do vírus HIV, com histórico de longas viagens por alguns países árabes e outros da Europa, foi diagnosticado com leishmanioses cutânea e visceral. A amplificação e sequenciamento direto de fragmentos genômicos de *hsp70* e miniexon permitiu a identificação de *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica* em amostra de medula óssea, o que a princípio poderia atribuir a uma espécie híbrida o papel de agente causador, hipótese que foi descartada com a detecção exclusiva de *L. (L.) tropica* em lesões cutâneas desse mesmo paciente¹¹⁶.

A existência de coinfeções em animais silvestres, domésticos e urbanos também têm sido descritas. *T. cruzi* e *T. rangeli* foram detectadas em amostras biológicas coletadas de gambás do gênero *Didelphis* e triatomíneos capturados em

região endêmica de doença de Chagas no Sudeste brasileiro⁷⁰; *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi* foram encontradas concomitantemente parasitando gambás residentes de fragmentos de Mata Atlântica do nordeste brasileiro, detectados por reações de PCR que utilizaram kDNA como alvo¹¹⁷. Em 2005, Savani *et al.*¹¹⁸ detectaram e identificaram, por microscopia e amplificação de SSUrDNA por PCR, *L. (L.) infantum chagasi* e *T. evansi* em um cão. A primeira infecção mista de um cão por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* foi descrita por Madeira *et al.*¹¹⁹, em 2006, que utilizou análises de isoenzimas e amplificação por PCR e *Southern blotting* com sondas específicas para kDNA para detectar e identificar os parasitas em amostras de pele, linfonodo e baço. Uma infecção tripla, detectada em sangue periférico e medula óssea de um tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), causada por *T. cruzi*, *T. rangeli* e *L. (L.) infantum chagasi* foi descrita com a identificação dos patógenos determinada por amplificação de mini-exon e kDNA em reações de PCR multiplex¹²⁰. Roedores que colonizam centros urbanos, como ratos e camundongos, foram também incriminados como hospedeiros de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, com identificação dos patógenos feita por PCR e sequenciamento do SSUrDNA¹²¹.

Considerando os relatos na literatura de infecções mistas envolvendo tripanossomatídeos em diversos contextos, e de como elas podem se apresentar no hospedeiro, com a presença dos diferentes parasitas em diferentes tecidos ou acometendo simultaneamente um mesmo órgão ou tecido, algumas simulações experimentais de infecção mista foram realizadas e submetidas aos testes de HRM, com o objetivo de se observar os perfis que poderiam ser formados em infecções como essas, hipoteticamente. Para isso, amostras de DNA genômico de cepas-referência de *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foram misturados aos pares em diferentes proporções e os perfis de dissociação e valores de T_m do Amplicon 1 foram analisados. Essas espécies foram escolhidas por

apresentarem, isoladamente, perfis bastante distintos de discriminação pela técnica proposta, além de serem representantes de formas distintas da doença e estarem envolvidas em trabalhos que descrevem casos de infecções mistas. Perfis e valores de T_m intermediários puderam ser observados nas amostras com diferentes proporções de mistura de DNA, que foram gradativamente se aproximando dos perfis das amostras puras (controle) conforme as concentrações de DNA de uma ou de outra espécie se aproximavam de 100%. Esses resultados mais uma vez mostram a especificidade das assinaturas produzidas por cada espécie nas análises de dissociação. Pequenas alterações nos perfis produzidos podem indicar, além da presença de um alvo diferente das espécies utilizadas como padrão, a presença de populações distintas do alvo amplificado. Na primeira situação perfis intermediários poderiam indicar a detecção de espécies, subespécies ou cepas diferentes das que seriam esperadas em determinada amostra; na outra, a detecção simultânea de dois ou mais organismos poderia ser a hipótese diagnóstica. Em ambas as situações, uma pesquisa mais detalhada deve ser realizada.

Visando a validação da técnica de *hsp70*-HRM em situações clínicas reais, um estudo retrospectivo foi realizado com amostras de biópsias parafinadas de pacientes da Clínica de Dermatologia da Santa Casa de São Paulo com diagnóstico clínico e histopatológico sugestivos de leishmaniose tegumentar, coletadas no período de 2005 a 2014. Testes de demonstração direta do parasita por microscopia ótica, imunohistoquímicos e imunológicos foram considerados na determinação do diagnóstico antes da aplicação do protocolo terapêutico. A detecção e identificação de *Leishmania* por *hsp70*-HRM foi realizada após o desfecho clínico de cada paciente, em um estudo retrospectivo. Dos 19 pacientes com suspeita epidemiológica e/ou clínica e/ou histopatológica de leishmaniose, 13 tiveram o diagnóstico confirmado após a análise conjunta dos testes complementares prévios

e dos ensaios detecção e identificação de *Leishmania* por *hsp70*-HRM. Os outros 6 pacientes, apesar da suspeita, tiveram diagnóstico final negativo para a doença.

Entre os casos positivos, a sensibilidade da técnica de *hsp70*-HRM foi de 92,6%, superior à alcançada pelos testes de PCR convencional para amplificação de SSUrDNA, de 57,1%. O SSUrDNA é um alvo empregado nas técnicas de detecção descritas entre as mais sensíveis, em função do número de cópias desse alvo no genoma de *Leishmania* (por volta de 100 cópias por genoma haploide). Por outro lado, a maior sensibilidade alcançada com o alvo *hsp70*, cujo número de cópias no genoma haploide do parasita é cerca de dez vezes menor, pode ser explicada pelo sistema de detecção de amplificação dos ensaios de PCR em tempo real. A detecção de amplificação por fluorescência de corantes intercalantes é bem caracterizada pela alta capacidade de detecção e tem sido descrita como ferramenta em trabalhos em que a detecção do DNA do parasita é dado fundamental para um melhor entendimento de diversos aspectos das leishmanioses⁶³.

Todos os pacientes com suspeita de leishmaniose confirmada pelo protocolo de *hsp70*-HRM têm origens geográficas coincidentes com as áreas onde a espécie de parasita identificada é endêmica, com exceção do paciente MSM. Na amostra desse paciente, que tem como origem geográfica o estado de Alagoas, o parasita detectado foi identificado como *L. (V.) guyanensis*, espécie cujo ciclo de transmissão no Brasil é aparentemente limitado à Região Norte (Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará)⁹³. A origem geográfica apontada nos prontuários, porém, não é um parâmetro que descreve a movimentação de pacientes entre diferentes regiões do país e informações mais precisas nesse sentido, muitas vezes são escassas em estudos retrospectivos.

Entre os pacientes em cujas amostras não foi detectado DNA de parasitas por SSU-rDNA-PCR ou *hsp70*-HRM, um foi considerado positivo pela análise de perfil histoquímico e por responder ao tratamento com Glucantime® (paciente MST). Um

outro paciente (JCS), teve resultados negativos em todos os exames complementares, com exceção da reação de Montenegro, e respondeu ao tratamento com Glucantime® com involução de lesão. Em ambos os casos alguns indícios sugerem a suspeita diagnóstica de leishmaniose tegumentar, apesar de não ter sido possível a detecção ou identificação de qualquer espécie de *Leishmania* pelos ensaios retrospectivos na amostra de sua lesão. A demonstração da presença do parasita pela detecção de seu DNA se dá por testes considerados potencialmente sensíveis, uma vez que a positividade é observada como resultado de uma amplificação exponencial do alvo por PCR. Porém, pode-se explicar que uma possível falha na detecção de DNA do parasita pode ter fundamentos biológicos ou físico-químicos. O primeiro se baseia no fato de que lesões cutâneas e mucocutâneas causadas principalmente por *L. (V.) braziliensis* têm como característica comum a escassez ou ausência de parasitas, o que muitas vezes dificulta o diagnóstico laboratorial¹²². O segundo é baseado no fato de que amostras biológicas que passam por tratamentos de fixação para análises histológicas estão sujeitas à degradação de DNA, principalmente em função sua exposição à formalina. Fatores como concentração das soluções de formalina e sais, assim como as temperaturas em que os protocolos de fixação são executados, influenciam diretamente na degradação de DNA em amostras biológicas e devem, por isso, ser consideradas quando testes de detecção DNA podem ser aplicados a essas amostras¹²³⁻¹²⁵.

Para todos os outros pacientes com a suspeita afastada de leishmaniose tegumentar com base nos exames complementares, os testes retrospectivos de HRM tiveram resultados negativos. As amostras de DNA de pacientes com diagnóstico final negativo para leishmaniose também devem ser consideradas informativas. A importância da coincidência entre os resultados negativos obtidos pelos exames complementares e os ensaios de HRM, reside na capacidade desses ensaios de

determinar corretamente resultados negativos. Em termos práticos, um resultado negativo pode evitar que o tratamento quimioterápico desnecessário, com seus efeitos colaterais, seja realizado, e o sofrimento do paciente, que acaba tendo que passar por diversos procedimentos dolorosos e retornos ao ambulatório, seja diminuído.

Ainda, o teste padronizado nesta tese demonstrou evidências da existência de híbridos naturais de *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) shawi*. Embora seja discutível a utilização de poucos alvos polimórficos na indicação da existência de híbridos, resultados apresentados indicam que esse pode ser mais um parâmetro a ser utilizado para, pelo menos, levantar a possibilidade de populações híbridas em ecossistemas naturais, contribuindo em estudos ecoepidemiológicos das leishmanioses.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

A padronização de protocolos eficientes direcionados para o diagnóstico das leishmanioses, enfermidades complexas que afetam milhões de pessoas no mundo, está entre os maiores desafios no que se refere ao combate à doença. Além da abordagem diagnóstica, a identificação de *Leishmania* em amostras de naturezas diversas é fonte de dados importantes para estudos ecológicos, epidemiológicos e sobre a biologia do parasita e sua interação com o hospedeiro.

A técnica de HRM, uma variação da PCR, classicamente descrita como sensível e específica, é executável de forma relativamente simples e tem como características inerentes a rapidez de performance e o alto potencial de automação, o que na rotina diagnóstica são fatores desejáveis. Trabalhos em diversas áreas têm validado a proposta de utilização dessa técnica para fins diagnósticos de diversas doenças genéticas e infecciosas.

O trabalho aqui exposto, considerando a importância do assunto que ele aborda, foi realizado em etapas onde características desejáveis de um protocolo diagnóstico foram avaliadas. O protocolo proposto, baseado na análise de perfis de dissociação de fragmentos do *hsp70* de *Leishmania*, permitiu a identificação de espécies do parasita endêmicas nas Américas, Eurásia e África, em culturas isoladas do parasita, amostras de infecções experimentais e em amostras clínicas e de campo, com confirmação dos resultados verificados por outros métodos. A detecção de DNA de *Leishmania* em quantidades equivalentes a menos de um parasita foi observada nos testes de padronização mesmo na presença de DNA humano e o potencial caráter quantitativo dos ensaios foram avaliados em testes quantitativos com parâmetros de qualidade satisfatórios.

A detecção e identificação dos parasitas envolvidos em infecções humanas a partir de biópsias parafinadas foram obtidas com a aplicação do protocolo proposto,

lançando dados importantes no que se refere ao prognóstico e ao delineamento de estratégias terapêuticas eficientes.

A detecção de perfis de dissociação diferentes dos obtidos por cepas-referência indicaram a existência de híbridos de espécies de *Leishmania* e puderam ser observados em amostras onde o DNA de diferentes espécies foi experimentalmente misturado. Resultados como esse, na prática, podem indicar a ocorrência de raros, mas possíveis casos de infecções mistas.

Analizados em conjunto, os resultados obtidos na execução desse trabalho apontam a utilização do protocolo aqui descrito como uma alternativa precisa e sensível e, por outro lado, relativamente simples na detecção e identificação dos agentes etiológicos das leishmanioses. Cabe aqui, como cumprimento de um objetivo específico deste trabalho, a descrição de um fluxo de procedimentos que indica, com base nos resultados obtidos, qual os passos metodológicos que deveriam ser seguidos para a obtenção de resultados de detecção e identificação de *Leishmania* a partir de amostras biológicas (Figura 21).

O processo de padronização e parte dos resultados obtidos durante a execução desse trabalho estão publicados em artigo anexado (Anexo A).

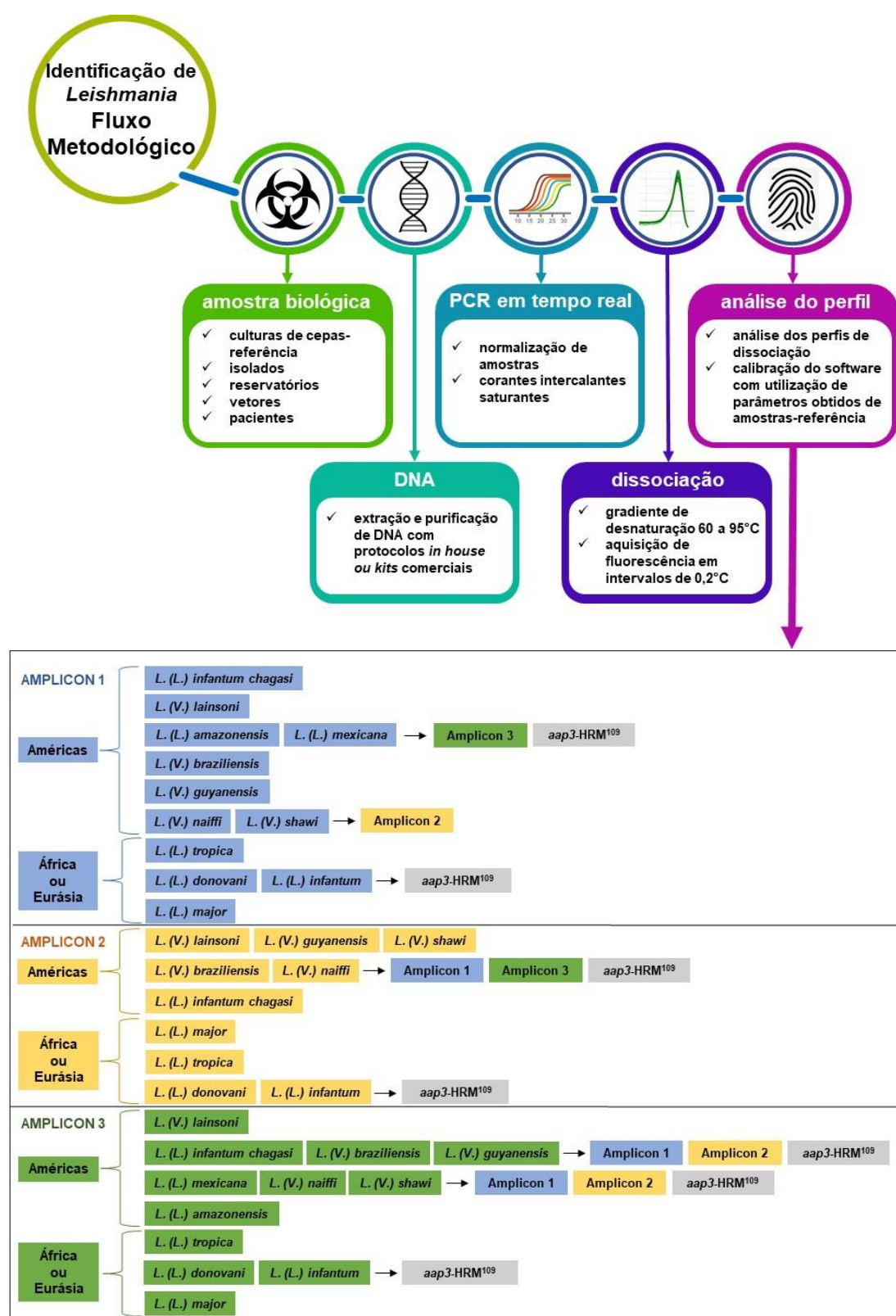


Figura 21 - Fluxo metodológico e estratégia proposta para detecção e identificação de *Leishmania* por HRM. Processos a serem empregados desde a coleta das amostras biológicas até a análise combinatória de perfis de dissociação obtidos dos 3 amplicons de *hsp70*. A utilização do protocolo de HRM utilizando *aap3* como alvo é indicado como teste complementar.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Ross R. Further Notes on Leishman's Bodies. Br Med J. 1903;2:1401.
2. Espinosa OA, Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MMG, Shaw JJ. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. Parasitology. 2016;145:430-42.
3. Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
4. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. New York: Academic Press; 1987. p. 1-120.
5. Saf'janova VM. Classification of the genus *Leishmania* Ross. The Leishmaniasis Protozoology. Lennigrad: Academy of Sciences; 1982. p. p. 95–101.
6. Ministério da Saúde. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Rev Saude Publica. 2010. 44. 200-2
7. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. Lancet. 2018;392:951-70.
8. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7:e35671.
9. Organization WH. Control of the leishmaniasis. Geneva: WHO Press; 2010.
10. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral Secretaria de Vigilância em Saúde. 2006.
11. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet. 2005;366:1561-77.
12. COSTA JML. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. Gazeta Médica da Bahia. 2005;75:3-17.
13. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev bras epidemiol. 2004;338-49.

14. Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101:577-9.
15. Dantas-Torres F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz. 2006;101:117-8.
16. KILLICK-KENDRICK R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. . Bull Soc Path Exot. 1985;78:9.
17. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Ann Parasitol Hum Comp. 1990;65:111-25.
18. Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100:811-27.
19. OPAS. Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas 2018 [2018]. Available from: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34857>.
20. Basano SA, Camargo LM. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Rev bras epidemiol. 2004;328-37.
21. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004;27:305-18.
22. Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. Rev Pan-Amaz Saude. 2010;1:20.
23. Braga RR, Lainson R, Ishikawa EA, Shaw JJ. *Leishmania* (*Viannia*) *utingensis* n. sp., a parasite from the sandfly *Lutzomyia* (*Viannamyia*) *tuberculata* in Amazonian Brazil. Parasite. 2003;10:111-8.
24. Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral grave: normas e condutas. 2006. 60
25. Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. J Clin Microbiol. 2007;45:21-5.

26. Grimaldi G, McMahon-Pratt D. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;91:37-42.
27. Cupolillo E, Grimaldi G, Jr., Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. Am J Trop Med Hyg. 1994;50:296-311.
28. de Ruiter CM, van der Veer C, Leeflang MM, Deborggraeve S, Lucas C, Adams ER. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. J Clin Microbiol. 2014;52:3147-55.
29. van Griensven J, Diro E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. Infect Dis Clin North Am. 2019;33:79-99.
30. Vega-Lopez F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis. 2003;16:97-101.
31. Tibayrenc M, Ayala FJ. Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. Parasitol Today. 1991;7:228-32.
32. Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980;77:6810-4.
33. Dietrich P, Dussan Mdel P, Floeter-Winter LM, Affonso MH, Camargo EP, Soares MB. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal gene spacers of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma conorhini*. Mol Biochem Parasitol. 1990;42:13-9.
34. Camargo EP, Sbravate C, Teixeira MM, Uliana SR, Soares MB, Affonso HT, et al. Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids. J Parasitol. 1992;78:40-8.
35. Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. J Eukaryot Microbiol. 1994;41:324-30.
36. Uliana SR, Affonso MH, Camargo EP, Floeter-Winter LM. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. Exp Parasitol. 1991;72:157-63.

37. Schonian G, Schweynoch C, Zlateva K, Oskam L, Kroon N, Graser Y, et al. Identification and determination of the relationships of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;77:19-29.
38. Macedo AM, Melo MN, Gomes RF, Pena SD. DNA fingerprints: a tool for identification and determination of the relationships between species and strains of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 1992;53:63-70.
39. 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.
40. Disch J, Pedras MJ, Orsini M, Pirmez C, de Oliveira MC, Castro M, et al. *Leishmania* (*Viannia*) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005;51:185-90.
41. Tuon FF, Sabbaga Amato V, Floeter-Winter LM, de Andrade Zampieri R, Amato Neto V, Siqueira Franca FO, et al. Cutaneous leishmaniasis reactivation 2 years after treatment caused by systemic corticosteroids - first report. *Int J Dermatol*. 2007;46:628-30.
42. Savani ES, Nunes VL, Galati EA, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Vet Parasitol*. 2009;160:18-24.
43. Savani ES, de Oliveira Camargo MC, de Carvalho MR, Zampieri RA, dos Santos MG, D'Auria SR, et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, Sao Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol*. 2004;120:229-33.
44. Garcez LM, Soares DC, Chagas AP, de Souza GC, Miranda JF, Fraiha H, et al. Etiology of cutaneous leishmaniasis and anthrophilic vectors in Juruti, Para State, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2009;25:2291-5.
45. de Lima AC, Zampieri RA, Tomokane TY, Laurenti MD, Silveira FT, Corbett CE, et al. *Leishmania* sp. identification by PCR associated with sequencing of target SSU rDNA in paraffin-embedded skin samples stored for more than 30 years. *Parasitol Res*. 2011;108:1525-31.
46. Bacha HA, Tuon FF, Zampieri RA, Floeter-Winter LM, Oliveira J, Nicodemo AC, et al. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* identification by PCR in the state of Para, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011;105:173-8.

47. Andrade MS, Courtenay O, Brito ME, Carvalho FG, Carvalho AW, Soares F, et al. Infectiousness of Sylvatic and Synanthropic Small Rodents Implicates a Multi-host Reservoir of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9:e0004137.
48. Amato VS, Tuon FF, de Andrade HF, Jr., Bacha H, Pagliari C, Fernandes ER, et al. Immunohistochemistry and polymerase chain reaction on paraffin-embedded material improve the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region. Int J Dermatol. 2009;48:1091-5.
49. Nicodemo AC, Amato VS, Miranda AM, Floeter-Winter LM, Zampieri RA, Fernandes ER, et al. Are the severe injuries of cutaneous leishmaniasis caused by an exacerbated Th1 response? Parasite Immunol. 2012;34:440-3.
50. Castilho TM, Camargo LM, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Am J Trop Med Hyg. 2008;78:122-32.
51. Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. J Clin Microbiol. 2003;41:540-6.
52. Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC, et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. Parasitology. 2010;137:1159-68.
53. Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin JC, Van der Auwera G. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:1453-61.
54. Graca GC, Volpini AC, Romero GA, Oliveira Neto MP, 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;107:664-74.
55. Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. J Clin Microbiol. 2004;42:2294-7.
56. 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;10:238-45.

57. Tellevik MG, Muller KE, Lokken KR, Nerland AH. Detection of a broad range of *Leishmania* species and determination of parasite load of infected mouse by real-time PCR targeting the arginine permease gene AAP3. *Acta Trop*. 2014;137:99-104.
58. Zackay A, Nasereddin A, Takele Y, Tadesse D, Hailu W, Hurissa Z, et al. Polymorphism in the HASPB repeat region of East African *Leishmania donovani* strains. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:e2031.
59. Quispe Tintaya KW, Ying X, Dedet JP, Rijal S, De Bolle X, Dujardin JC. Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. *J Infect Dis*. 2004;189:1035-43.
60. Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;47:349-58.
61. Marfurt J, Niederwieser I, Makia ND, Beck HP, Felger I. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;46:115-24.
62. Cupolillo E, Grimaldi Junior G, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 1995;73:145-55.
63. Galluzzi L, Ceccarelli M, Diotallevi A, Menotta M, Magnani M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2018;11:273.
64. Folgueira C, Requena JM. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol Rev*. 2007;31:359-77.
65. Shonhai A, Maier AG, Przyborski JM, Blatch GL. Intracellular protozoan parasites of humans: the role of molecular chaperones in development and pathogenesis. *Protein Pept Lett*. 2011;18:143-57.
66. Ramirez CA, Requena JM, Puerta CJ. Identification of the HSP70-II gene in *Leishmania braziliensis* HSP70 locus: genomic organization and UTRs characterization. *Parasit Vectors*. 2011;4:166.
67. Folgueira C, Quijada L, Soto M, Abanades DR, Alonso C, Requena JM. The translational efficiencies of the two *Leishmania infantum* HSP70 mRNAs, differing in their 3'-untranslated regions, are affected by shifts in the temperature of growth through different mechanisms. *J Biol Chem*. 2005;280:35172-83.

68. Folgueira C, Canavate C, Chicharro C, Requena JM. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. *Parasitology*. 2007;134:369-77.
69. Bock JH, Langer PJ. Sequence and genomic organization of the hsp70 genes of *Leishmania amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;62:187-97.
70. Ramirez LE, Lages-Silva E, Alvarenga-Franco F, Matos A, Vargas N, Fernandes O, et al. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. *Acta Trop*. 2002;84:189-98.
71. Fraga J, Veland N, Montalvo AM, Praet N, Boggild AK, Valencia BM, et al. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74:142-50.
72. Fraga J, Montalvo AM, Maes L, Dujardin JC, Van der Auwera G. HindII and SduI digests of heat-shock protein 70 PCR for *Leishmania* typing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;77:245-7.
73. da Silva LA, de Sousa Cdos S, da Graca 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;10:77-83.
74. Van der Auwera G, Dujardin JC. Species typing in dermal leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28:265-94.
75. 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;91:312-8.
76. Wesley RD, Simpson L. Studies on kinetoplast DNA. 3. Kinetic complexity of kinetoplast and nuclear DNA from *Leishmania tarentolae*. *Biochim Biophys Acta*. 1973;319:267-76.
77. Lanar DE, Levy LS, Manning JE. Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1981;3:327-41.
78. Kleisen MC, Borst P, Weijers PJ. The structure of kinetoplast DNA. 1. The mini-circles of *Crithidia lucilae* are heterogeneous in base sequence. *Eur J Biochem*. 1976;64:141-51.

79. Kleisen CM, Weislogel PO, Fonck K, Borst P. The structure of kinetoplast DNA. 2. Characterization of a novel component of high complexity present in the kinetoplast DNA network of *Crithidia luciliae*. Eur J Biochem. 1976;64:153-60.
80. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. Pharmacogenomics. 2007;8:597-608.
81. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem. 1997;245:154-60.
82. Taylor CF. Mutation scanning using high-resolution melting. Biochem Soc Trans. 2009;37:433-7.
83. Song C, Castellanos-Rizaldos E, Bejar R, Ebert BL, Makrigiorgos GM. DMSO Increases Mutation Scanning Detection Sensitivity of High-Resolution Melting in Clinical Samples. Clin Chem. 2015;61:1354-62.
84. Ruskova L, Raclavsky V. The potential of high resolution melting analysis (hrma) to streamline, facilitate and enrich routine diagnostics in medical microbiology. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2011;155:239-52.
85. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994;22:4673-80.
86. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. 1999 Contract No.: 41.
87. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. Nucleic Acids Res. 2007;35:W43-6.
88. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988;16:1215.
89. Sambrook JF, E. F. ; Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1989.
90. Zampieri RA, Laranjeira-Silva MF, Muxel SM, Stocco de Lima AC, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. High Resolution Melting Analysis Targeting hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of *Leishmania* Species. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0004485.

91. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94:441-8.
92. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55:611-22.
93. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. 2017.
94. Jennings YL, de Souza AA, Ishikawa EA, Shaw J, Lainson R, Silveira F. Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Para state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania (Viannia) guyanensis* x *Leishmania (Viannia) shawi shawi*. *Parasite.* 2014;21:39.
95. de Lima ACS. Caracterização biológica e molecular de cepas híbridas *Leishmania (Viannia) guyanensis/Leishmania (Viannia) shawi shawi* isoladas de pacientes com leishmaniose tegumentar oriundos da região amazônica, Santarém, PA-Brasil [[tese]]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2016.
96. Aronson NE, Joya CA. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. *Infect Dis Clin North Am.* 2019;33:101-17.
97. Nicolas L, Milon G, Prina E. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *J Microbiol Methods.* 2002;51:295-9.
98. Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BA, Moreira OC, et al. SYBR Green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2012;5:15.
99. Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M. Detection and characterization of *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. *PLoS One.* 2014;9:e88845.
100. Nasereddin A, Jaffe CL. Rapid diagnosis of Old World Leishmaniasis by high-resolution melting analysis of the 7SL RNA gene. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2240-2.
101. Bousslimi N, Ben-Ayed S, Ben-Abda I, Aoun K, Bouratbine A. Natural infection of North African gundi (*Ctenodactylus gundi*) by *Leishmania tropica* in the focus of cutaneous leishmaniasis, Southeast Tunisia. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86:962-5.

102. Toz SO, Culha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Alkan MZ, Vardarli AT, et al. A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human and dog clinical samples in Turkey. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:e2205.
103. Aghaei AA, Rassi Y, Sharifi I, Vatandoost H, Mollaie H, Oshaghi MA, et al. First report on natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus sergenti* due *Leishmania tropica* by high resolution melting curve method in South-eastern Iran. Asian Pac J Trop Med. 2014;7:93-6.
104. Talmi-Frank D, Jaffe CL, Nasereddin A, Warburg A, King R, Svobodova M, et al. *Leishmania tropica* in rock hyraxes (*Procavia capensis*) in a focus of human cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2010;82:814-8.
105. Baneth G, Zivotofsky D, Nachum-Biala Y, Yasur-Landau D, Botero AM. Mucocutaneous *Leishmania tropica* infection in a dog from a human cutaneous leishmaniasis focus. Parasit Vectors. 2014;7:118.
106. Baneth G, Nachum-Biala Y, Shabat Simon M, Brenner O, Gaier S, Rojas A, et al. *Leishmania major* infection in a dog with cutaneous manifestations. Parasit Vectors. 2016;9:246.
107. Hernandez C, Alvarez C, Gonzalez C, Ayala MS, Leon CM, Ramirez JD. Identification of six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. Parasit Vectors. 2014;7:501.
108. Tsukayama P, Nunez JH, De Los Santos M, Soberon 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:e1956.
109. Muller KE, Zampieri RA, Aoki JI, Muxel SM, Nerland AH, Floeter-Winter LM. Amino acid permease 3 (aap3) coding sequence as a target for *Leishmania* identification and diagnosis of leishmaniases using high resolution melting analysis. Parasit Vectors. 2018;11:421.
110. Potapov V, Ong JL. Examining Sources of Error in PCR by Single-Molecule Sequencing. PLoS One. 2017;12:e0169774.
111. Kuang Z, Zhang C, Pang H, Ma Y. A rapid high-resolution melting method for differentiation of *Leishmania* species targeting lack gene. Acta Trop. 2018;178:103-6.
112. Carillo S, Henry L, Lippert E, Girodon F, Guiraud I, Richard C, et al. Nested high-resolution melting curve analysis a highly sensitive, reliable, and simple method

for detection of JAK2 exon 12 mutations--clinical relevance in the monitoring of polycythemia. *J Mol Diagn*. 2011;13:263-70.

113. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Ribeiro Rda S. [Cutaneous leishmaniasis in Amazonia. Report of the 1st human case of mixed infection, determined by 2 different *Leishmania* species: *Leishmania brasiliensis* and *Leishmania mexicana amazonensis*]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1984;26:272-5.

114. Oliveira Neto MP, Marzochi MC, Grimaldi Junior G, Pacheco RS, Toledo LM, Momen H. Concurrent human infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1986;80:587-92.

115. Martinez E, Mollinedo S, Torrez M, Munoz M, Banuls AL, Le Pont F. Co-infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum/L. chagasi* in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96:529-32.

116. Al Balushi A, Khamis F, Klaassen CHW, Gangneux JP, Van Hellemond JJ, Petersen E. Double Infection With *Leishmania tropica* and *L. major* in an HIV Patient Controlled With High Doses of Amphotericin B. *Open Forum Infect Dis*. 2018;5:ofy323.

117. Trueb I, Portela RD, Franke CR, Carneiro IO, Ribeiro GJ, Jr., Soares RP, et al. *Trypanosoma Cruzi* and *Leishmania* Sp. Infection in Wildlife from Urban Rainforest Fragments in Northeast Brazil. *J Wildl Dis*. 2018;54:76-84.

118. Savani ES, Nunes VL, Galati EA, Castilho TM, Araujo FS, Ilha IM, et al. Occurrence of co-infection by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:739-41.

119. Madeira MF, Schubach A, Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100:442-5.

120. De Araujo VA, Boite MC, Cupolillo E, Jansen AM, Roque AL. Mixed infection in the anteater *Tamandua tetradactyla* (Mammalia: Pilosa) from Para State, Brazil: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania infantum*. *Parasitology*. 2013;140:455-60.

121. Ferreira Ede C, Cruz I, Canavate C, de Melo LA, Pereira AA, Madeira FA, et al. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. *BMC Vet Res*. 2015;11:71.

122. Ministério da Saúde. Leishmaniose tegumentar americana - diagnóstico clínico e diferencial 2006.
123. Wiegand P, Domhover J, Brinkmann B. DNA degradation in formalin fixed tissues. *Pathologe*. 1996;17:451-4.
124. Tokuda Y, Nakamura T, Satonaka K, Maeda S, Doi K, Baba S, et al. Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde. *J Clin Pathol*. 1990;43:748-51.
125. Koshiba M, Ogawa K, Hamazaki S, Sugiyama T, Ogawa O, Kitajima T. The effect of formalin fixation on DNA and the extraction of high-molecular-weight DNA from fixed and embedded tissues. *Pathol Res Pract*. 1993;189:66-72.

RESEARCH ARTICLE

High Resolution Melting Analysis Targeting *hsp70* as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of *Leishmania* Species

Ricardo Andrade Zampieri¹, Maria Fernanda Laranjeira-Silva¹, Sandra Marcia Muxel¹, Ana Carolina Stocco de Lima², Jeffrey Jon Shaw³, Lucile Maria Floeter-Winter^{1*}

¹ Physiology Department, Biosciences Institute, São Paulo University, São Paulo, São Paulo, Brazil,

² Pathology Department, Medical Faculty, São Paulo University, São Paulo, São Paulo, Brazil,

³ Parasitology Department, Biomedical Institute, São Paulo University, São Paulo, São Paulo, Brazil

* lucile@ib.usp.br



Abstract

Background

Protozoan parasites of the genus *Leishmania* cause a large spectrum of clinical manifestations known as Leishmaniases. These diseases are increasingly important public health problems in many countries both within and outside endemic regions. Thus, an accurate differential diagnosis is extremely relevant for understanding epidemiological profiles and for the administration of the best therapeutic protocol.

Methods/Principal Findings

Exploring the High Resolution Melting (HRM) dissociation profiles of two amplicons using real time polymerase chain reaction (real-time PCR) targeting heat-shock protein 70 coding gene (*hsp70*) revealed differences that allowed the discrimination of genomic DNA samples of eight *Leishmania* species found in the Americas, including *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) shawi*, and three species found in Eurasia and Africa, including *L. (L.) tropica*, *L. (L.) donovani* and *L. (L.) major*. In addition, we tested DNA samples obtained from standard promastigote culture, naturally infected phlebotomines, experimentally infected mice and clinical human samples to validate the proposed protocol.

Conclusions/Significance

HRM analysis of *hsp70* amplicons is a fast and robust strategy that allowed for the detection and discrimination of all *Leishmania* species responsible for the Leishmaniases in Brazil and Eurasia/Africa with high sensitivity and accuracy. This method could detect less than one parasite per reaction, even in the presence of host DNA.

OPEN ACCESS

Citation: Zampieri RA, Laranjeira-Silva MF, Muxel SM, Stocco de Lima AC, Shaw JJ, Floeter-Winter LM (2016) High Resolution Melting Analysis Targeting *hsp70* as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of *Leishmania* Species. PLoS Negl Trop Dis 10(2): e0004485. doi:10.1371/journal.pntd.0004485

Editor: Alain Debrabant, US Food and Drug Administration, UNITED STATES

Received: October 1, 2015

Accepted: February 2, 2016

Published: February 29, 2016

Copyright: © 2016 Zampieri et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was funded by: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) www.fapesp.br; and Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) www.cnpq.br. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author Summary

The different clinical forms of the Leishmaniasis range from cutaneous to visceral infections and are caused by organisms belonging to the genus *Leishmania*. Controversy over the validity of different molecular methods to correctly identify a species hinders the association of a given species with different clinical forms, complicating the prognosis and the development of suitable treatment protocols. A correct identification leads to a better understanding of the action and consequent development of new drugs and immunological reactions. It also provides important information about the relationship of each species with its hosts (humans, animal reservoirs and sandflies) in different geographical areas and ecological situations, helping to design control strategies. Today, PCR is the most commonly used method for *Leishmania* identification, but even though several targets have been described, no simple and direct protocol has emerged. In this paper, we coupled *hsp70* real-time PCR with the determination of amplicon melting profiles in order to explore polymorphic regions by HRM analysis. This methodology yielded discriminatory melting temperature (T_m) values for Brazilian and Eurasian/African *Leishmania* species. The protocol has proven to be 100% reliable with both clinical and experimental samples. The major advantage of the presently described method is that it is simple, less expensive, highly sensitive and easily automated.

Introduction

Leishmaniasis are a major worldwide public health problem and manifest themselves as a spectrum of diseases that may be exacerbated by other infections, such as human immunodeficiency virus. According to the World Health Organization, these diseases are endemic in 98 countries on 5 continents, with more than 350 million people at risk [1, 2]. Clinically, Leishmaniasis can be broadly divided as either cutaneous or visceral, but neither form is exclusively linked to a particular species. Although cutaneous manifestations of the diseases are not life threatening, these manifestations can result in obstruction or destruction of the pharynx, larynx and nose in their final stages [2]. The visceral form is the most severe form, characterized by fever, loss of weight, splenomegaly, hepatomegaly, lymphadenopathies and anaemia, often with fatal outcomes if not timely treated [3].

The severity of the disease and its therapeutic responses are variable and depend on the patient's immune response, the *Leishmania* species and even the parasite strain [4]. In this scenario, the development of optimized protocols for discriminating between the different *Leishmania* species is extremely useful and important in clinical management and treatment. The ability to evaluate the most appropriate species-specific treatments also supports the elucidation of the mechanisms of action of new drugs and the establishment of new species-specific treatment protocols. Furthermore, the identification of these parasites allows the generation of important data for clinical, epidemiological and ecological studies.

There are very few publications addressing a Leishmaniasis diagnosis using a High Resolution Melting (HRM) analysis, a methodology that detects differences in the nucleotide composition of a specific real-time PCR product. The method is based on thermodynamic differences in the dissociation curve profiles of amplicons generated from real-time PCR. The generated curves are specific signatures that identify polymorphisms due to small differences in nucleotide composition. In spite of the paucity of papers on the HRM method, some workers have already used it to discriminate *Leishmania* using targets against 7SL RNA [5, 6], *haspb* [7], the

rRNA ITS sequence [8, 9], the rRNA ITS sequence coupled to *hsp70* [10, 11] and a FRET-based assay using MPI and 6PGD [12].

Amongst several targets described for *Leishmania* identification, the heat-shock protein 70 coding gene (*hsp70*) has proven to be useful in identifying many species of different geographical origins [13–17].

In this work, we propose a more efficient protocol using HRM analyses targeting the *hsp70* sequence for the discrimination of seven Brazilian *Leishmania* species, as well as three Eurasian and African species. This methodology was validated with DNA from reference strains, experimental infections in mice, human clinical samples and naturally infected phlebotomine sand flies.

Materials and Methods

Organisms

Promastigotes of *L. (L.) tropica* (MHOM/SU/60/OD), *L. (L.) donovani* (MHOM/IN/80/DD8), *L. (L.) infantum chagasi* (MCER/BR/1981/M6445), *L. (L.) major* (MHOM/IL/81/Friedlin), *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), *L. (L.) mexicana* (MNYC/BZ/62/M379), *L. (L.) lainsoni* (MHOM/BR/81/M6426), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533) and *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/84/M8408) were grown at 25°C in M199 medium with 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Procyclic forms of *Trypanosoma cruzi* (Y strain) and *T. brucei* (427 strain) were grown at 28°C in liver-infusion-tryptose medium and SDM-79, respectively, with 10% fetal bovine serum (Life Technologies). Human DNA, FMUS-P-IOF-2016, obtained from USP Medical School, was used in specificity tests.

Trypanosomatids DNA

DNA samples from reference strains were purified by a salting-out procedure using an adaptation of the protocol described by Miller et al. 1988 [18]. Approximately 2.5×10^9 promastigotes in stationary growth culture were centrifuged at 3000 x g for 10 min at 25°C. The cells were resuspended in 6 mL of lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 400 mM NaCl; 2 mM EDTA) and lysed by the addition of 600 µL of 10% SDS. After overnight digestion with 1 mg of proteinase K at 37°C, 2 mL of saturated NaCl solution was added to lysate, and then, the lysate was vigorously mixed for 15 seconds and centrifuged for 15 minutes at 25°C for the removal of precipitated proteins. Two volumes of cold absolute ethanol were added to the supernatant, and the precipitated DNA was washed with 70% ethanol and resuspended in 1 mL of TE buffer (10 mM Tris, pH 7.4; 1 mM EDTA).

Clinical, experimental and natural DNA samples/ethical statements

DNA from samples obtained from fresh humans biopsies, collected by doctors at Clinical Hospital of Medical Faculty USP, or fixed and paraffin-embedded samples from the collection of Instituto Evandro Chagas, (Belem-Para) were used in accordance to the norms established by the National Committee of Ethics in Research (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, CONEP/CNS), resolution 196/96 with the approval of the Ethics in Research Committees of the Institutions of origin (CAPPesq no. 0804/07, IEC n°. 0029/2007).

Fresh experimentally infected BALB/c mice samples of *L. (L.) amazonensis* or *L. (V.) braziliensis* were obtained 6 weeks after infection when the animals were sacrificed and tissues were collected and DNA was obtained as described below; the procedures involving the use of BALB/c mice had the approval of the Ethical Committee for use of Animals of Biomedical

Sciences Institute of University of São Paulo (CEUA-ICB-USP), under protocol #145 of October 20th, 2011, according to Brazilian Federal Law 11.794 of October 8th 2008.

DNA from infected phlebotomines captured in nature were purified using the commercial DNeasy Tissue & Blood kit (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer's manual. Paraffin-embedded samples were prepared according to de Lima et al. 2011 [19]. The DNA concentration was measured by spectrophotometry.

PCR assays

Initially, we amplified the *hsp70* 234 bp fragments for all species analyzed in this study using the primers described by Graça et al. [17]. The alignment of the nucleotide sequence of those fragments was used to design primers for HRM analysis. Oligonucleotides used in the PCR assays to amplify a 144 bp fragment of *hsp70* (amplicon 1) were *hsp70C* reverse, previously described by Graça et al. 2012 [17], and a new forward oligonucleotide designed and named *hsp70F2* (5'-GGAGAACTACGCGTACTCGATGAAG-3'). For the amplification of a 104 bp fragment of *hsp70* (amplicon 2) specific to the species from the *L. (Viannia)* subgenus, the oligonucleotides *hsp70F1* (5'-AGCGCATGGTGAACGATGCGTC-3') and *hsp70R1* (5'-CTTCA TCGAGTACGCGTAGTTCTCC-3') were designed. The *hsp70* amplicon sequences are shown in Fig 1 and indicate the position of the primers. Conventional PCR reactions were performed on a Mastercycler Gradient Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) with TopTaq Master Mix (QIAGEN) in a final volume of 25 µL with 200 nM of each primer and 50 ng of genomic DNA as a template. The thermal cycling conditions were as follows: an initial denaturation step of 94°C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 30 sec and extension at 72°C for 30 sec, with a final extension at 72°C for 10 min. Real-time PCR reactions were performed using MeltDoc Master Mix for HRM with the fluorophore SYTO9 (Life Technologies) in a final volume of 20 µL with 200 nM of each primer and 50 ng of genomic DNA. The real time amplification conditions were as follows: an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec and annealing/extension at 60°C for 30 sec, with the acquisition of fluorescent signals at the end of each extension step, followed by the dissociation curve for HRM analysis in Thermocycler PikoReal96 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Cloning and sequencing

The 234 bp *hsp70* fragment produced by conventional PCR, as described by Graça et al. 2012 [17], from each *Leishmania* species used in this study was purified and cloned into a pGEM-T vector using the pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA) and *E. coli* SURE competent cells. The recombinant plasmids from at least three colonies were purified, and they were sequenced with T7 and SP6 primers and the BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequencing was performed on an ABI 3130 XL Platform (Life Technologies).

Target quantification with standard curves

Recombinant plasmids containing the *hsp70* target were linearized with *ScaI*. The plasmid copy number was calculated considering the molar mass concentration, and a serial dilution on a tenth proportion was used to produce standard curves for each quantification test. The quality parameters for the standard curves were obtained by PikoReal Software (Thermo Fischer Scientific) analysis, including the correlation coefficient, linear dynamic range and PCR efficiency.

A

Amplicon 1	5	15	25	35	45	55	65	
<i>L. (L.) tropica</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GCTCAGCGAC	TCGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAAAGATAGC	
<i>L. (L.) donovani</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GCTCGGCGAC	TCGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGACGATAGC	
<i>L. (L.) i. chagasi</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GCTCGGCGAC	TCGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGACGATAGC	
<i>L. (L.) major</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GCTCAGCGAC	TCGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGACGATAGC	
<i>L. (L.) amazonensis</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GCTCGGCGAC	TCGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGACGACACC	
<i>L. (L.) mexicana</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GCTCGGCGAC	TCGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGACGACACC	
<i>L. (V.) lainsoni</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GACCTCCGAC	TCGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAGGAGAGC	
<i>L. (V.) braziliensis</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GCTCTCCGAC	ACGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAGGAGAGC	
<i>L. (V.) guyanensis</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GATCGCCGAC	ACGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAGGAGAGC	
<i>L. (V.) naiffi</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GCTCGCCGAC	ACGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAGGAGAGC	
<i>L. (V.) shawi</i>	GGAGAACTAC	GCGTACTCGA	TGAAGAACAC	GATCGCCGAC	ACGAACGTGT	CCGGCAAGCT	GGAGGAGAGC	

Amplicon 1	75	85	95	105	115	125	135	
<i>L. (L.) tropica</i>	GACAAAGGCCA	CGCTGAACAA	GGAGATCGAC	GTGGTGCTGG	AGTGGCTGAG	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA
<i>L. (L.) donovani</i>	GACAAAGGCCA	CGCTGAACAA	GGAGATCGAC	GTGACGCTGG	AGTGGCTGAG	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA
<i>L. (L.) i. chagasi</i>	GACAAAGGCCA	CGCTGAACAA	GGAGATCGAC	GTGACGCTGG	AGTGGCTGAG	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA
<i>L. (L.) major</i>	GACAAAGGCCA	CGCTGAACAA	GGAGATCGAC	GCGGCGCTGG	AGTGGCTGAG	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA
<i>L. (L.) amazonensis</i>	GACAAAGTCTGA	CACTGAACAA	GGAGATCGAG	GCGGCGCTGG	AGTGGCTGAG	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA
<i>L. (L.) mexicana</i>	GACAAAGTCTGA	CGCTGAACAA	GGAGATCGAT	GCGGCGCTGG	AGTGGCTGAG	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA
<i>L. (V.) lainsoni</i>	GACAAAGGCCA	CGCTGAACCTC	GGCGATCGAC	ACGGCGCTGG	AGTGGCTGAA	CAACAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA
<i>L. (V.) braziliensis</i>	GACAGGTCCG	CGCTGAACCTC	GGCGATCGAC	ACGGCGCTGG	AGTGGCTGAA	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA
<i>L. (V.) guyanensis</i>	GACAGGACCG	CGCTGAACCTC	GGCGATCGAC	ACGGCGCTGG	AGTGGCTGAA	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA
<i>L. (V.) naiffi</i>	GACAGGACCA	CGCTGACCTC	GGCGATCGAC	GCGGCGCTGG	AGTGGCTGAA	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA
<i>L. (V.) shawi</i>	GACAGGGCCG	CGCTGAACCTC	GGCGATCGAC	GCGGCGCTGG	AGTGGCTGAA	CAGCAACCAG	GAGGCGTCGA	AGGA

B

Amplicon 2	5	15	25	35	45	55	65
<i>L. (V.) lainsoni</i>	AGCGCATGGT	GAACGATGCG	TGCAAGTACG	AGCAGGCCGA	CAAGATGCAG	CGCGAGCGCG	TGGAGGCGAA
<i>L. (V.) braziliensis</i>	AGCGCATGGT	GAACGATGCG	TGCAAGTACG	AGCAGGCCGA	CAAGATGCAG	CGCGAGCGCG	TGGAGGCGAA
<i>L. (V.) guyanensis</i>	AGCGCATGGT	GAACGATGCG	TGCAAGTACG	AGCAGGCCGA	CAAGATGCAG	CGCGAGCGCG	TGGAGGCGAA
<i>L. (V.) naiffi</i>	AGCGCATGGT	GAACGATGCG	TGCAAGTACG	AGCAGGCCGA	CAAGATGCAG	CGCGAGCGCG	TGGAGGCGAA
<i>L. (V.) shawi</i>	AGCGCATGGT	GAACGATGCG	TGCAAGTACG	AGCAGGCCGA	CAAGATGCAG	CGCGAGCGCG	TGGAGGCGAA

Amplicon 2	75	85	95
<i>L. (V.) lainsoni</i>	GAACGCTCTG	GAGAACTACG	CGTACTCGAT
<i>L. (V.) braziliensis</i>	GAACGGCCTG	GAGAACTACG	CGTACTCGAT
<i>L. (V.) guyanensis</i>	GAACGCTCTG	GAGAACTACG	CGTACTCGAT
<i>L. (V.) naiffi</i>	GAACGGCCTG	GAGAACTACG	CGTACTCGAT
<i>L. (V.) shawi</i>	GAACGCTCTG	GAGAACTACG	CGTACTCGAT

Fig 1. Nucleotide sequence of hsp70 amplicons and primer localization. Alignment of the nucleotide sequence of amplicon 1 (A) and amplicon 2 (B) of each *Leishmania* species used in the HRM analysis. The underlined sequences indicate the position of the primers used in real-time PCR assays; the grey boxed nucleotides represent the variable regions found among reference strains of *Leishmania*.

doi:10.1371/journal.pntd.0004485.g001

High resolution melting (HRM)

HRM assays were performed at the end of each real-time PCR. The amplicon dissociation analysis was performed by capturing fluorescence signals in 0.2°C intervals and holding for 10 seconds in each range of the melting curve (between 60°C to 95°C). The acquisition of fluorescence data and the construction of dissociation profiles were performed using PikoReal96 software. HRM software normalizes melting curves relatively to values from pre- and post-melting point assigned as 100% and 0%, respectively. Then the software determines the normalized difference that means the signal-to-noise ratio difference of each sample versus a user-defined sequence that can be any. The call efficiency is the benchmark measured in percentage of the similarity between two dissociation profiles using fluorescence and T_m values as parameters. The software performs a paired comparison between the profile of the sample of unknown identity and each standard and chooses the standard that has the closest value. The “call” identity refers to the designation allotted to the sample being identified based on that of the closest standard.

The graphs containing the means and standard deviations of the T_m values obtained by the HRM analyses were made in GraphPad PRISM v. 6.02 software.

Results

Polymorphic sites on the *hsp70* gene

The *hsp70* sequences deposited in GenBank for *L. (L.) tropica* (FN395025.1), *L. (L.) donovani* (AY702003.1), *L. (L.) infantum* (HF586351.1), *L. (L.) major* (HF586346.1), *L. (L.) amazonensis* (EU599090.1), *L. (L.) mexicana* (EU599091.1), *L. (L.) infantum chagasi* (FN395036.1), *L. (V.) braziliensis* (GU071173.1), *L. (V.) guyanensis* (EU599093.1), *L. (V.) lainsoni* (GU071174.1), *L. (V.) naiffi* (GU071183.1) and *L. (V.) shawi* (GU071177.1) were used for oligonucleotide design. DNA from all *Leishmania* reference strains analyzed in this study was used as templates in conventional PCR, and the amplicons were cloned and sequenced to confirm the sequences to those deposited in GenBank. The obtained *hsp70* amplicon sequences were then aligned, and we chose regions containing polymorphic sites to be used in HRM methodology (Fig 1).

The two pairs of oligonucleotides depicted in the alignment produced the two expected PCR fragments for all *Leishmania* reference strain DNA used as a template. The 144 bp amplicon 1 is the PCR product used in the amplification of all *Leishmania* species. The 104 bp amplicon 2 was produced by the oligonucleotide pair designed for species of the *L. (Viannia)* subgenus (Figs 1, S1 and S2).

Specificity and sensitivity of HRM assays

The average and standard deviation of the melting temperature (T_m) of each amplicon was determined in duplicate from three independent experiments using 50 ng of DNA as a template from each reference species. The melting profiles and obtained T_m values of *hsp70* amplicon 1 for all species studied are presented in Figs 2 and 3 and Table 1. For a reliable discrimination, we calculated the dispersion of T_m values and only considered differences in T_m values exceeding 0.3°C (Fig 2).

The standard curves for the quantification assays using the cloned target showed good linear correlations (0.99 for all curves) and efficiencies varying from 92.37 to 97.23% for all tested species, in the range of 10^1 to 10^7 copies (S3 Fig). Moreover, to evaluate the specificity/sensitivity of *hsp70* amplicon 1 as a target, HRM assays were performed using genomic DNA from the seven references species of *Leishmania* in proportions of 1:1 or 1:100 in relation to a human

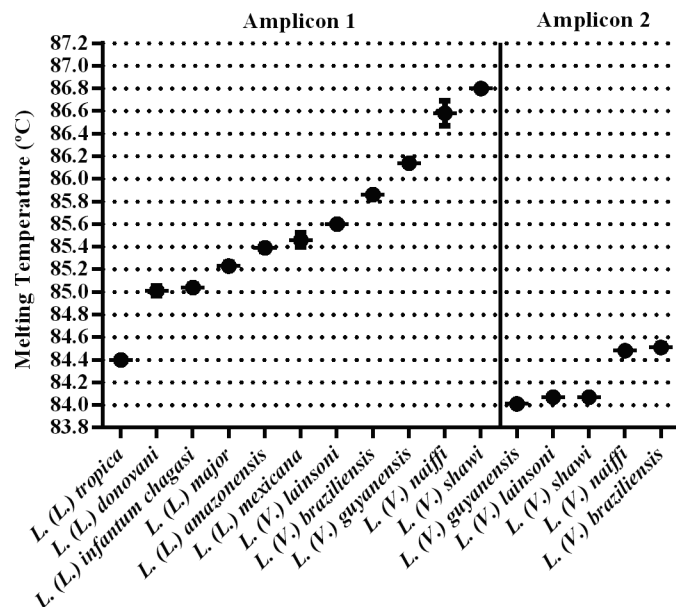


Fig 2. Tm values obtained with the HRM assay. Representative dispersion graph of individual Tm values for each studied *Leishmania* species using 50 ng of genomic DNA as a template for *hsp70* amplicon 1 and amplicon 2. The plots show the average and standard deviation of the Tm values. Each species was tested in duplicate in three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pntd.0004485.g002

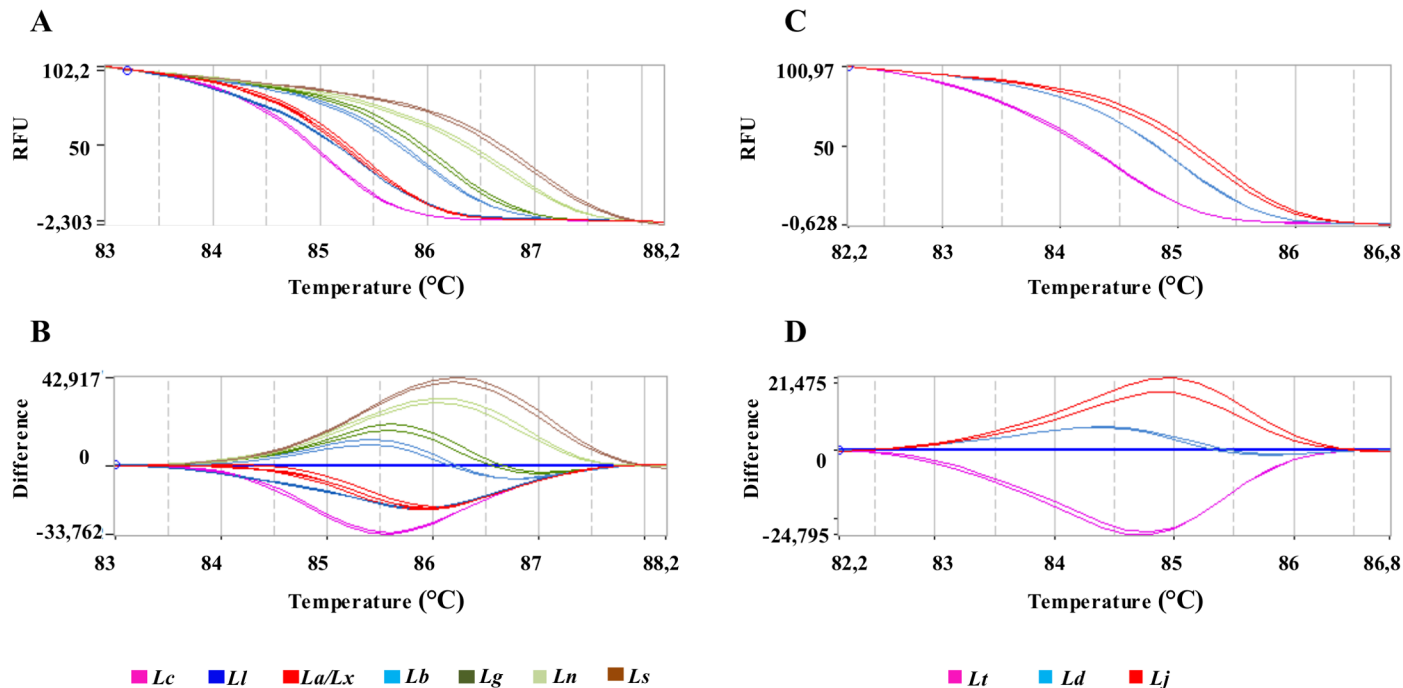


Fig 3. HRM plots of *hsp70* amplicon 1. Representative melting profiles of *hsp70* amplicon 1 obtained with DNA from *Leishmania* species present in Brazil (A, B) or DNA from *Leishmania* species of Eurasia and Africa (C, D). (A, C): Normalized melting curves; (C, D): normalized difference curves. (Lt): *L. (L.) tropica*; (Ld): *L. (L.) donovani*; (Lc): *L. (L.) infantum chagasi*; (Lj): *L. (L.) major*; (La): *L. (L.) amazonensis*; (Lx): *L. (L.) mexicana*; (Ll): *L. (V.) lainsoni*; (Lb): *L. (V.) braziliensis*; (Lg): *L. (V.) guyanensis*; (Ln): *L. (V.) naiffi* and (Ls): *L. (V.) shawi*. Each sample was tested in duplicate.

doi:10.1371/journal.pntd.0004485.g003

Table 1. Tm values obtained in the HRM analysis targeting the hsp70 gene of different Leishmania species. Fifty ng of genomic DNA from each species was tested in duplicate in three independent experiments.

Leishmania species	Tm (°C) Amplicon 1	Tm (°C) Amplicon 2
<i>L. (L.) tropica</i>	84.40 ± 0.02	-
<i>L. (L.) donovani</i>	85.01 ± 0.04	-
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	85.04 ± 0.03	-
<i>L. (L.) major</i>	85.23 ± 0.03	-
<i>L. (L.) amazonensis</i>	85.39 ± 0.03	-
<i>L. (L.) mexicana</i>	85.46 ± 0.06	-
<i>L. (V.) lainsoni</i>	85.60 ± 0.01	84.07 ± 0.01
<i>L. (V.) braziliensis</i>	85.86 ± 0.01	84.51 ± 0.03
<i>L. (V.) guyanensis</i>	86.14 ± 0.02	84.01 ± 0.00
<i>L. (V.) naiffi</i>	86.58 ± 0.11	84.48 ± 0.01
<i>L. (V.) shawi</i>	86.80 ± 0.01	84.07 ± 0.01

doi:10.1371/journal.pntd.0004485.t001

reference DNA (FMUSP-IOF-2016), and the call identification agreed 100% with the reference samples, even in samples where the call efficiency was approximately 75% (Table 2).

To test if the initial amount of target DNA caused a variation in the Tm, serial dilutions containing 50 ng to 50 fg (DNA amount corresponding to 5.0×10^5 to 0.5 of parasite) of *Leishmania* DNA from reference strains were used as a template to produce both hsp70 amplicon 1 (Fig 4A) and hsp70 amplicon 2 (Fig 4B). The Tm variation obtained for both amplicons in each species showed that some species presented a fluctuation of Tm values that overlapped with other species.

In the case of overlapping Tm values for amplicon 1, a sequential discrimination can be performed by HRM analysis of amplicon 2. This amplicon is specific for the *L. (Viannia)* subgenus species, allowing the segregation of two patterns that group *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni* and *L. (V.) shawi* with Tm = $83.92 \pm 0.04^\circ\text{C}$ or *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) braziliensis* with Tm = $84.39 \pm 0.04^\circ\text{C}$ (Figs 4 and 5).

The Ct values obtained in the amplification curves of amplicon 2, using DNA of all *Leishmania* studied indicated that the reactions were at least 5 orders of magnitude more specific to *Leishmania (Viannia)* species than for the *L. (Leishmania)* species (Figs 5C and S2), confirming that amplicon 2 can be used to discriminate *L. (Viannia)* from the *L. (Leishmania)* species.

Moreover, using the information on the geographical origin of the samples associated with the HRM analysis of hsp70 amplicon 2 allowed for the discrimination between *L. (L.) donovani*

Table 2. Call efficiency obtained in the HRM analysis targeting the hsp70 gene of different Leishmania species in the presence of two different amounts of human reference (FMUSP-IOF-2016) DNA. The "call" column shows the identification name given by the software to the unknown samples based on names given to the reference samples; (CHA): *L. (L.) infantum chagasi*; (AMA): *L. (L.) amazonensis*; (LAI): *L. (V.) lainsoni*; (BRA): *L. (V.) braziliensis*; (GUY): *L. (V.) guyanensis*; (NAI): *L. (V.) naiffi* and (SHA): *L. (V.) shawi*. Each condition was tested in duplicate.

Leishmania species	DNA proportion 1:1		DNA proportion 1:100	
	Call	Efficiency (%)	Call	Efficiency (%)
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	CHA	92.55	CHA	79.95
<i>L. (L.) amazonensis</i>	AMA	89.90	AMA	75.80
<i>L. (V.) lainsoni</i>	LAI	89.20	LAI	74.35
<i>L. (V.) braziliensis</i>	BRA	89.85	BRA	78.10
<i>L. (V.) guyanensis</i>	GUY	91.90	GUY	79.40
<i>L. (V.) naiffi</i>	NAI	95.05	NAI	81.95
<i>L. (V.) shawi</i>	SHA	93.00	SHA	81.55

doi:10.1371/journal.pntd.0004485.t002

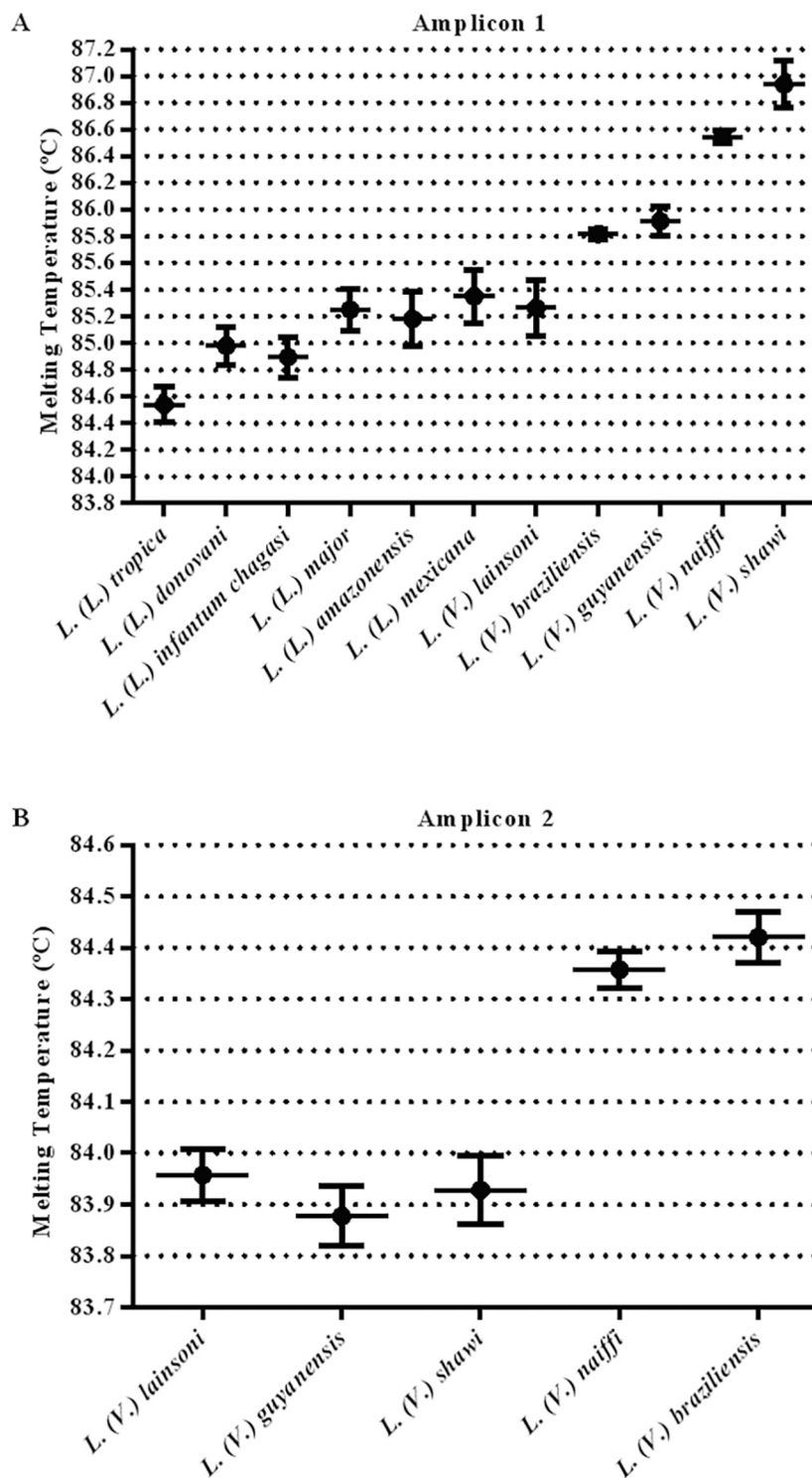


Fig 4. Effect of the amount of target DNA on the Tm values of hsp70 amplicons. Representative dispersion graph of individual Tm values for each studied *Leishmania* species for amplicon 1 (A) and for amplicon 2 (B). Each point corresponds to the average and standard deviation of the variation in the Tms obtained within a range of 50 ng to 50 fg of genomic DNA used as a template. Each concentration point was measured in duplicate.

doi:10.1371/journal.pntd.0004485.g004

and *L. (L.) infantum chagasi*; among *L. (L.) major*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* and *L. (V.) lainsoni*.

DNA from uninfected mouse, human, or *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* were used as templates and compared to the standardized positive range of T_m values for the tested *Leishmania* species. No cross-reactivity was detected. For these controls, characteristic T_m values (*T. cruzi*: 83.08 ± 0.07°C and *T. brucei*: 83.91 ± 0.06°C) or no amplification was observed (mouse and human) (S4 Fig).

Validation of the HRM Protocol with other Leishmania strains and with experimental, clinical and field samples

The HRM analysis of *hsp70* amplicon 1 obtained with DNA from other *Leishmania* isolates also used as reference strains resulted in a 100% correlation with the T_m values of the reference

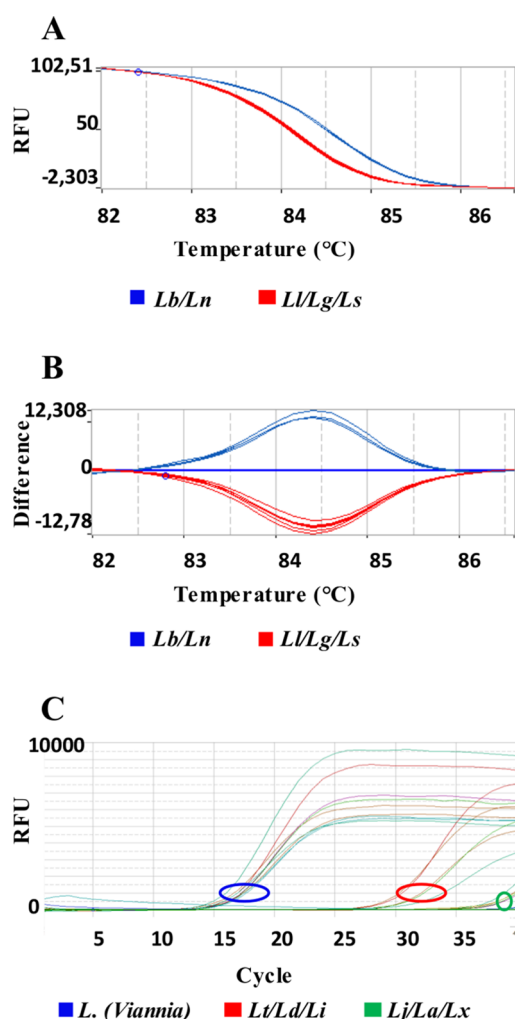


Fig 5. HRM plots of *hsp70* amplicon 2. Representative melting profiles of *hsp70* amplicon 2. Panels (A) and (B) show the melting profiles of American *L. (Viannia)* species with data organized in normalized melting curves and normalized difference curves, respectively. (Lb): *L. (V.) braziliensis*; (Ln): *L. (V.) naiffi*; (Ll): *L. (V.) lainsoni*; (Lg): *L. (V.) guyanensis* and (Ls): *L. (V.) shawi*. Panel (C) shows the amplification curves in relation to the Ct, using DNA of the same species as A and B plus (Lt): *L. (L.) tropica*; (Ld): *L. (L.) donovani*; (Li): *L. (L.) infantum*; (La): *L. (L.) amazonensis*; (Lx): *L. (L.) mexicana* and (Lj): *L. (L.) major*. Each sample was tested in duplicate.

doi:10.1371/journal.pntd.0004485.g005

Table 3. Call efficiency obtained in the HRM analysis targeting the *hsp70* gene of different *Leishmania* strains The “call” column shows the names given by the software to the unknown samples based on names given to the reference samples: *L. (L.) infantum chagasi* (CHA), *L. (L.) amazonensis* (AMA), *L. (V.) lainsoni* (LAI), *L. (V.) braziliensis* (BRA), *L. (V.) guyanensis* (GUY), *L. (V.) naiffi* (NAI) and *L. (V.) shawi* (SHA). Each condition was tested in duplicate in three independent experiments.

<i>Leishmania</i> strain / ID	Call	Efficiency (%)
<i>L. (L.) infantum chagasi</i> / MHOM/BR/74/M2682	CHA	67.88
<i>L. (L.) amazonensis</i> / MPHI/BR/99/M12275	AMA	83.35
<i>L. (V.) lainsoni</i> / IUBI/BR/91/M13469	LAI	73.72
<i>L. (V.) braziliensis</i> / MHOM/BR/2001/M19675	BRA	85.47
<i>L. (V.) braziliensis</i> / MHOM/BR/96/M15923	BRA	81.12
<i>L. (V.) guyanensis</i> / MHOM/BR/2001/M19869	GUY	78.73
<i>L. (V.) naiffi</i> / MDAS/BR/82/M6934	NAI	87.75
<i>L. (V.) shawi</i> / MHOM/BR/2001/M19670	SHA	91.10
<i>L. (V.) shawi</i> / MHOM/BR/2001/M19664	SHA	87.90
<i>L. (V.) shawi</i> / MHOM/BR/1990/M19703	SHA	88.10

doi:10.1371/journal.pntd.0004485.t003

species used in this study (Table 3). Some of those strains represent isolates obtained from different geographical regions in Brazil, and experimentally corroborated the identification through the HRM protocol for possible polymorphisms.

The intra-specific variability was further assessed by the *in silico* analysis of polymorphism of 186 *hsp70* entries from *L. (L.) tropica*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) martiniquensis* and *L. siamensis*. All the sequences were aligned to include the regions of amplicons 1 and 2. The aligned sequences were then examined for polymorphisms among species as well as among strains of the same species. We then calculated the percentage of similarity and estimated the theoretical T_m value of both amplicons (S1 Table). If we assume that the nucleotide differences that we detected are real polymorphisms and not sequencing errors then we can see from S1 Table that the differences in the theoretical T_m values of each species results in the same discriminatory pattern. Of the 186 strains analyzed, only two strains of *L. infantum*, MCAN/IR/96/LON-49 and LEM75/zymodeme1, presented a theoretical T_m value whose difference was higher than 0.3°C. We cannot rule out the possibilities that this difference is in fact a real one, due to sequencing errors or reflects different taxa.

In the absence of *bona fide* samples we also determined the theoretical T_m of amplicons 1 and 2 (S1 Table) of two *Leishmania* species found in America, *L. (V.) peruviana* and *L. (V.) panamensis*, that occur outside Brazil. The obtained data indicated that these two species could be differentiated from the others *L. (Viannia)* species by the coupled HRM analysis of the two amplicons.

The theoretical T_m value of the African *L. (L.) aethiopica*, potentially allowed the discrimination from *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* and *L. (L.) major*, but not from *L. (L.) tropica* (S1 Table). The *enriettii* complex members *L. (L.) martiniquensis* and *L. siamensis* presented identical theoretical T_m values.

To validate the HRM protocol for different types of sample preparations, sixteen DNA obtained from real biological samples, like fresh tissue from hamster inoculated with infected sample from human or dog cases; cell culture of the human isolated strain; human fresh tissue; human paraffin-embedded tissue; tissues from experimentally infected BALB/c mice and naturally infected phlebotomines, that had been previously tested in our laboratory by sequencing of SSU rDNA [20] or by discriminatory PCR targeting *g6pd* [21], were submitted to HRM

Table 4. Identification of *Leishmania* in clinical and experimentally infected and field samples by the HRM analysis targeting *hsp70* gene. The *hsp70* amplicons 1 or 2 of DNA from each sample were submitted to the HRM analysis. The results were compared with a previous identification performed by SSU rDNA sequencing [17] or *g6pd* PCR [18]. ^(a) fresh tissue from hamster inoculated with infected sample; ^(b) cell culture of the human isolated strain; ^(c) human fresh tissue; ^(d) human paraffin-embedded tissue; ^(e) experimentally infected BALB/c mice; ^(f) naturally infected *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis*; and ^(g) naturally infected *Lu. (Nyssomyia) whitmani*; (N/A): not applicable.

Sample Source	HRM Identification		Previous Diagnosis	Method
	Amplicon 1	Amplicon 2		
Human ^a	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (Viannia)</i> sp.	SSU + seq
Human ^a	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (Viannia)</i> sp.	SSU + seq
Human ^a	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (Viannia)</i> sp.	SSU + seq
Human ^a	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>g6pd</i> PCR
Human ^b	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>g6pd</i> PCR
Human ^b	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>g6pd</i> PCR
Human ^b	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>g6pd</i> PCR
Human ^c	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>g6pd</i> PCR
Human ^d	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (Viannia)</i> sp.	SSU + seq
Canine ^a	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (Viannia)</i> sp.	SSU + seq
Canine ^a	<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	N/A	<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	SSU + seq
Mouse ^e	<i>L. (L.) amazonensis</i>	N/A	<i>L. (L.) amazonensis</i>	SSU + seq
Mouse ^e	<i>L. (L.) amazonensis</i>	N/A	<i>L. (L.) amazonensis</i>	SSU + seq
Mouse ^e	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>g6pd</i> PCR
Phlebotomine ^f	<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	N/A	<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	SSU + seq
Phlebotomine ^g	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>g6pd</i> PCR

doi:10.1371/journal.pntd.0004485.t004

analysis. The results obtained presented a correlation with the results obtained with the other targets (Table 4).

Discussion

The establishment of optimized protocols for the detection and identification of the aetiological agents of Leishmaniasis are extremely useful tools in a clinical context. Identifying the species can lead to species-specific treatment protocols to promote a better efficacy of treatment, assessing the need for patient follow up as well as the development and understanding of the mode of action of potential new drugs.

Several methodologies targeting different genomic or mitochondrial DNA have been described in the past 20 years, and PCR is currently the preferred method in studies involving the detection and identification of *Leishmania*. These methodologies have been developed by designing primers that exploit species-specific sequence polymorphisms in different targets, such as kDNA [22], the SSU rDNA gene [20, 23], the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene (*g6pd*) [21, 24], rDNA internal transcribed spacers (ITSs) [25], *hsp70* [13–17] and cysteine proteinase B gene (*cpb*) [7, 26]. However, none of these methods represents a gold standard because the targeted polymorphisms were unsuitable for simple and direct identification protocols. These PCR analyses involved the use of multiple targets requiring a combination of several primers creating the need of running more than one reaction to identify a single sample. The multiplex PCR that uses several pair of primers in one reaction and restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) of PCR products both need of a subsequent DNA fractionation by gel electrophoresis. These procedures require experienced operators to interpret the results, besides the risk of laboratory contamination with amplicons, due to the manipulation of PCR product.

Another way to exploit DNA polymorphisms is the determination of the C+G composition of PCR products from conserved regions by calculating the T_m of the amplicon in a melting curve. HRM methodology has been successfully used for *Leishmania* identification using different targets, such as the 7SL RNA gene that discriminated *L. tropica*, *L. major* and species that cause visceral *Leishmaniases* in clinical samples [5, 6]. Additionally, using the same target, researchers determined that rodent *Ctenodactylus gundi* is a potential host of *L. tropica* in Tunisia [5]. Polymorphisms on *haspb* (Hydrophilic Acylated Surface Protein B gene) analyzed by HRM allowed the differentiation of strains of *L. (L.) donovani* from distinct regions of East Africa [7]. In Southeastern Iran, the rRNA ITS sequence incriminated *Phebotomus sergenti* as a natural vector of *L. (L.) tropica* [10], or the discrimination between *L. (L.) tropica* and *L. (L.) infantum* in Turkey [9]. HRM analysis of the ITS-1 rRNA region discriminated *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) aethiopica* and *L. (L.) infantum* in samples from Middle East, Asia, Africa and Europe [8]. The combination of two targets, *hsp70* and the rRNA ITS1 sequence, using the absolute HRM values allowed for the discrimination of six American *Leishmania* species [11] and MPI/6PGD-FRET PCR distinguished *L. (V.) braziliensis* from *L. (V.) peruviana* [12].

Here, we described an algorithm using HRM methodology for the rapid detection and discrimination of *Leishmania* species circulating in Brazil and Eurasia/Africa (Fig 6). We used the sequence coding for *hsp70*, but in order to obtain a discriminatory PCR product, we designed the primers to encompass a region that was no larger than 144 bp and that had relevant polymorphisms for HRM analysis, that is, shifts of AT base pairs to CG or vice-versa. Moreover, to be effective, the total amount of polymorphisms was taken into account, and compensatory changes were avoided. Using these criteria, we obtained two PCR products: amplicon 1 and amplicon 2. Using the algorithm described in Fig 6, the analysis of the produced melting profiles of amplicon 1 for the Brazilian species allowed for the discrimination of *L. (L.) i. chagasi*, *L. (L.) amazonensis*/*L. (L.) mexicana*/*L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) braziliensis*/*L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) shawi* using differences in the T_m of at least 0.3°C. For Eurasian samples, amplicon 1 produced values with the same 0.3°C interval to discriminate *L. (L.) tropica* from *L. (L.) infantum*.

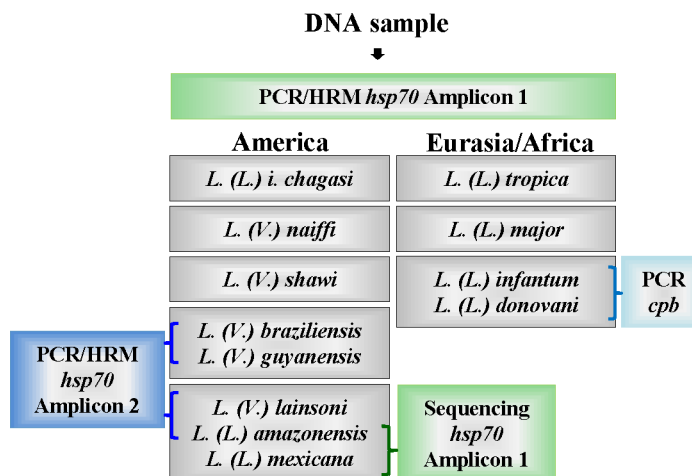


Fig 6. Schematic algorithm representation for *Leishmania* identification in Brazilian or Eurasian/African samples. Purified DNA was submitted to *hsp70* PCR to produce amplicon 1. The melting analysis of *hsp70* amplicon 1 for American samples discriminates *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) shawi*. The grouping of *L. (V.) braziliensis*/*L. (V.) guyanensis* can be discriminated by producing *hsp70* PCR amplicon 2. Amplicon 2 also resolve the grouping *L. (L.) amazonensis*/*L. (L.) mexicana*/*L. (V.) lainsoni*, which is positive for *L. (V.) lainsoni*, or by sequencing *hsp70* PCR amplicon 1 to discriminate between *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) mexicana*. For Eurasian/African samples, the melting analysis of *hsp70* amplicon 1 discriminates *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major* and the *L. (L.) donovani*/*L. (L.) infantum* group, which can be solved by *cpb* PCR [7].

doi:10.1371/journal.pntd.0004485.g006

(*L.*) *major* and from *L. (L.) donovani*/*L. (L.) infantum*, but these two species cannot be discriminated from each other (Fig 2).

The occurrence of an overlap in the T_m value for the Brazilian species *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) lainsoni* after a positive reaction of amplicon 1 can be solved by a positive reaction of amplicon 2. This amplicon sequence is specific for *Leishmania* (*Viannia*) species, so *L. (L.) amazonensis* will not be amplified and *L. (V.) lainsoni* will present the corresponding T_m value (Fig 5). The occurrence of an overlap in the T_m value for the American species *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) mexicana* can be solved by amplicon 1 sequencing because this amplicon is not identical, but there are two mismatches (position 82 A to G and position 100 G to T in *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) mexicana*, respectively (Fig 1), that are compensatory in the melting profile. It is interesting to note that these two species are very closely related. Uliana et al. [23] distinguished *L. (L.) amazonensis* from *L. (L.) mexicana* by SSU rDNA, but Castilho et al. [21] also failed to distinguish these species by *g6pd* because the region of the *g6pd* sequence that was used is identical in the two species. It is also interesting that Hernandez et al. [11], using a larger amplicon (337 bp) of *hsp70*, succeeded in differentiating *L. (L.) mexicana* from *L. (L.) amazonensis*; however, Fraga et al. [13] failed to distinguish these two species using RFLP in another region of *hsp70*. However, when the complete nucleotide sequence of the *hsp70* PCR fragment of 1268 bp is used, the discrimination between the two species can be achieved [27]. These problems once again emphasize that one gene or a particular sequence of a gene is not reliable to define a species or plot its phylogeny. Recently, Real et al. [28] showed that *L. (L.) mexicana* and *L. (L.) major* had, respectively, 5 and 7 species-specific orthologous gene families, while *L. (L.) amazonensis* had 23 different gene families. Moreover, the geographical parameter can also be used; Uliana et al. used SSU rDNA polymorphism to show that these species present a characteristic distribution in Latin America that correlates to monoclonal antibody profiles [29].

The T_m overlap for Eurasian species occurred for *L. (L.) donovani* and *L. (L.) infantum*, which presented identical sequences for amplicon 1. Again, the geographical origin of the sample can be used because *L. (L.) donovani* is more frequently found in India and East Africa and presents anthroponotic behavior. *L. (L.) infantum* is found in Africa, China and the Mediterranean and shows zoonotic behavior [30]. However, the two species can be discriminated by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) or multilocus microsatellite typing (MLMT) [30]. Recently, the *haspb* coding region was initially used in a classical PCR coupled to RFLP [31], while the gene coding for *cpb* was used as a target in conventional PCR [7]. We propose to use the latter in case of doubt between the two species (Fig 6).

The *in silico* analysis of amplicon 1 and 2 from other *Leishmania* species from America or from Eurasia/Africa, also indicated the potentiality of the *hsp70* HRM protocol to discriminate *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) panamensis* and *L. (L.) aethiopica*/*L. (L.) martiniquensis*/*L. siamensis* from *L. (L.) donovani* and *L. (L.) major* but not from *L. (L.) tropica*. It is interesting to note that the ITS-HRM analysis applied to *L. (L.) tropica*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major* and *L. (L.) donovani* [8] presented exactly the same degree of resolution of the *hsp70* HRM described here.

We also noticed that the initial amount of template DNA influenced the T_m determination (Fig 4). This T_m variation could be important in cases where the T_m values are in the same range and can lead to a misidentification if the reference sample is at a different concentration. This is the case for *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) lainsoni*. However, as has been previously explained, the use of *hsp70* amplicon 2 allowed for the discrimination between these two species. The two other species that presented an overlapping T_m range depending on the initial amount of DNA were *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis*, which could be discriminated by the use of an HRM analysis on the same amplicon 2.

In fact, when we applied the protocol described here to other *Leishmania* isolates, the obtained “call” (the identification of the problem sample in relation to the reference samples) presented a 100% correlation with the reference strains (Table 3).

The test of sixteen samples consisting of fresh hamster tissue from animals injected with human or dog biopsy macerates, fresh or paraffin embedded human biopsies, tissues of experimentally infected BALB/c mice or even naturally infected phlebotominae, produced identification “calls” comparable to the identification results using SSU rDNA sequencing or *g6pd* PCR (Table 4), showing that the source of the sample as well as its conservation do not interfere in the HRM protocol. Moreover, the use of HRM protocol is easier than the use of SSU rDNA and/or *g6pd* PCR, since those methods require either sequencing of the product or three or more distinct PCRs followed by gel electrophoresis analysis.

Overall, the *hsp70* HRM protocol described herein accurately and sensitively identified *Leishmania* species that are important in the majority of cases of Leishmaniasis in the Brazil and Eurasia. The test is simple and rapid, and its use in the clinic or in research samples has many advantages, such as a lower total cost for the identification of a sample and other characteristics that facilitate its application. There is no need for sequencing or gel fractionation to analyze the product, thus avoiding laboratory contamination with PCR products because these products are discarded without being manipulated. It also reduces the need for trained personnel to analyze the fractionation profile of an electrophoretic gel or sequencing data to provide a result. Also the HRM assay presents a possibility of quantifying parasites present in samples because it is a real-time PCR-based technique. Moreover, the whole process can be automated because the analyzer software will produce the “call” result by comparing the tested samples to the reference sample identities, which must always be included in the reactions.

In conclusion, the protocol described herein is a low cost, reliable, easy to apply, potentially automated procedure that is a good alternative for the detection, quantification and identification of *Leishmania* species in biological and clinical samples.

Supporting Information

S1 Fig. Nucleotide sequence of *hsp70* amplicon 2 and primer localization. The underlined sequences indicate the position of the primers used in real-time PCR assays; the grey boxed nucleotides represent the mutation points found among reference strains of *Leishmania*. The black boxed nucleotides represent mismatches that prevent the annealing of oligonucleotide *hsp70F1* to the *L. (Leishmania)* spp. complementary sequence.
(TIFF)

S2 Fig. Electrophoretic profile of conventional PCR products of polymorphic regions of the *hsp70* gene from reference *Leishmania* species. *hsp70* amplicons 1 (A) and *hsp70* amplicons 2 (B) were fractionated by electrophoresis in 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. DNA from reference strains of *Leishmania* are named as follows: (Lt): *L. (L.) tropica*; (Ld): *L. (L.) donovani*; (Lc): *L. (L.) infantum chagasi*; (Lj): *L. (L.) major*; (La): *L. (L.) amazonensis*; (Lx): *L. (L.) mexicana*; (Ll): *L. (V.) lainsoni*; (Lb): *L. (V.) braziliensis*; (Lg): *L. (V.) guyanensis*; (Ln): *L. (V.) naiffi* and (Ls): *L. (V.) shawi*. (L): 100 bp DNA ladder and (ntc): no template control, without DNA.
(TIFF)

S3 Fig. Efficiency of *hsp70* amplicon 1 real-time PCR for DNA from distinct *Leishmania* species. Standard curves were constructed with recombinant plasmids containing amplicon 1 sequence from *L. (L.) amazonensis* (A), *L. (L.) infantum chagasi* (B), *L. (V.) guyanensis* (C) and *L. (V.) lainsoni* (D). The assays used as a template underwent a 10-fold serial dilution representing

1 x 10⁶ to 1 x 10¹ plasmid copies per reaction and were performed in duplicate.
(TIFF)

S4 Fig. HRM plots of *hsp70* amplicon 1 from *Trypanosoma*. Representative melting profiles of *hsp70* amplicon 1 obtained from the genomic DNA of *T. cruzi* and *T. brucei*. (A): Normalized melting curves; (B): normalized difference curves and (C): dispersion graph of individual plots from *T. cruzi* (*Tc*) and *T. brucei* (*Tb*) compared to *L. (L.) tropica* (*Lt*).
(TIFF)

S1 Table. Polymorphisms detection by *in silico* analysis of *Leishmania hsp70* sequences. The *hsp70* regions encompassing amplicon 1 or amplicon 2 were retrieved from GenBank Database [32] using the sentence “heat shock protein 70 kDa” as descriptor words in “search” field. The obtained sequences were formatted as FASTA files and aligned on BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.1.8 [33]. The identity indexes were obtained by pairwise alignments on BioEdit software. Only sequences encompassing the whole amplicon were analyzed. Theoretical melting temperatures of hypothetical amplicons were calculated using OligoCalc oligonucleotide properties on-line calculator [34].
(DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RAZ MFLS JJS LMF. Performed the experiments: RAZ SMM ACSdL. Analyzed the data: RAZ MFLS SMM ACSdL JJS LMF. Contributed reagents/materials/analysis tools: LMF. Wrote the paper: RAZ MFLS SMM JJS LMF.

References

1. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012; 7(5):e35671. doi: [10.1371/journal.pone.0035671](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671) PMID: [22693548](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22693548/)
2. World Health O. Control of the leishmaniasis. World Health Organization technical report series. 2010 (949:):xii-xiii, 1–186, back cover. PMID: [21485694](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21485694/)
3. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. 2004; 27(5):305–18. PMID: [15225981](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15225981/)
4. Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. J Clin Microbiol. 2007; 45(1):21–5. PMID: [17093038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17093038/)
5. Bousslimi N, Ben-Ayed S, Ben-Abda I, Aoun K, Bouratbine A. Natural Infection of North African Gundi (*Ctenodactylus gundi*) by *Leishmania tropica* in the Focus of Cutaneous Leishmaniasis, Southeast Tunisia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2012; 86(6):962–5. doi: [10.4269/ajtmh.2012.11-0572](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0572) PMID: [22665601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22665601/)
6. Nasereddin A, Jaffe CL. Rapid Diagnosis of Old World Leishmaniasis by High-Resolution Melting Analysis of the 7SL RNA Gene. J Clin Microbiol. 2010; 48(6):2240–2. doi: [10.1128/JCM.00553-10](https://doi.org/10.1128/JCM.00553-10) PMID: [20392923](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20392923/)
7. Zackay A, Nasereddin A, Takele Y, Tadesse D, Hailu W, Hurissa Z, et al. Polymorphism in the HASPB Repeat Region of East African *Leishmania donovani* Strains. PLoS neglected tropical diseases. 2013; 7(1).
8. Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schonian G, Toz SO, Jaffe CL, et al. Detection and Identification of Old World *Leishmania* by High Resolution Melt Analysis. PLoS neglected tropical diseases. 2010; 4(1).
9. Toz SO, Culha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Alkan MZ, Vardarli AT, et al. A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human and dog clinical samples in Turkey. PLoS neglected tropical diseases. 2013; 7(5):e2205. doi: [10.1371/journal.pntd.0002205](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002205) PMID: [23675543](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23675543/)
10. Aghaei AA, Rassi Y, Sharifi I, Vatandoost H, Mollaie H, Oshaghi MA, et al. First report on natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus sergenti* due *Leishmania tropica* by high resolution melting curve

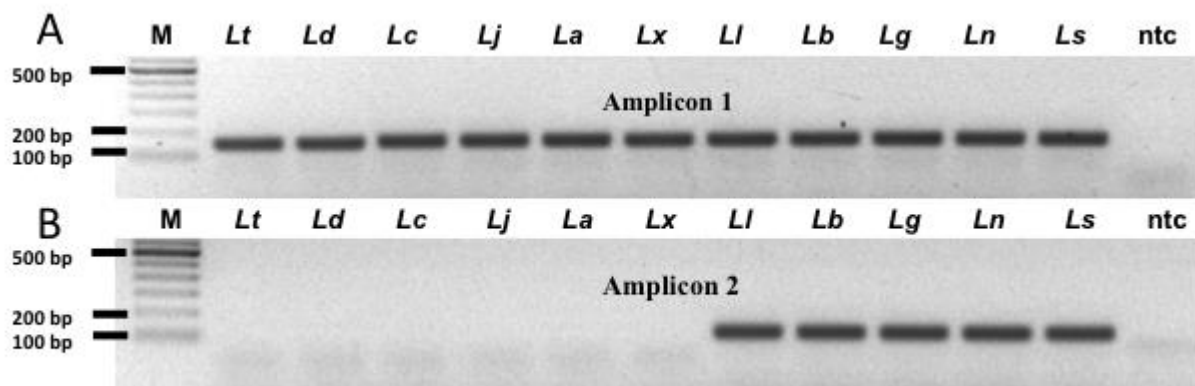
- method in South-eastern Iran. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2014; 7(2):93–6. doi: [10.1016/S1995-7645\(14\)60002-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60002-X) PMID: [24461520](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24461520/)
11. Hernandez C, Alvarez C, Gonzalez C, Ayala MS, Leon CM, Ramirez JD. Identification of Six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. Parasites & vectors. 2014; 7:501.
12. Tsukayama P, Nunez JH, De Los Santos M, Soberon 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 neglected tropical diseases. 2013; 7(1):e1956. doi: [10.1371/journal.pntd.0001956](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001956) PMID: [23301111](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23301111/)
13. 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. Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2010; 10(2):238–45. doi: [10.1016/j.meegid.2009.11.007](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.007) PMID: [19913110](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19913110/)
14. Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC, et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. Parasitology. 2010; 137(8):1159–68. doi: [10.1017/S0031182010000089](https://doi.org/10.1017/S0031182010000089) PMID: [20441679](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20441679/)
15. Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. J Clin Microbiol. 2004; 42(5):2294–7. PMID: [15131217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15131217/)
16. Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin JC, Van der Auwera G. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2012; 31(7):1453–61.
17. Graça GC, Volpini AC, Romero GA, Oliveira Neto MP, 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. PMID: [22850958](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22850958/)
18. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic acids research. 1988; 16(3):1215. PMID: [3344216](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3344216/)
19. de Lima AC, Zampieri RA, Tomokane TY, Laurenti MD, Silveira FT, Corbett CE, et al. *Leishmania* sp. identification by PCR associated with sequencing of target SSU rDNA in paraffin-embedded skin samples stored for more than 30 years. Parasitology research. 2011; 108(6):1525–31. doi: [10.1007/s00436-010-2208-0](https://doi.org/10.1007/s00436-010-2208-0) PMID: [21161272](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21161272/)
20. Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. The Journal of eukaryotic microbiology. 1994; 41(4):324–30. PMID: [8087103](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8087103/)
21. Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. J Clin Microbiol. 2003; 41(2):540–6. PMID: [12574243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12574243/)
22. 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. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1993; 49(3):348–56. PMID: [8396860](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8396860/)
23. Uliana SR, Affonso MH, Camargo EP, Floeter-Winter LM. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. Experimental parasitology. 1991; 72(2):157–63. PMID: [2009920](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2009920/)
24. Castilho TM, Camargo LM, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2008; 78(1):122–32. PMID: [18187795](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18187795/)
25. Cupolillo E, Grimaldi Junior G, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. Molecular and biochemical parasitology. 1995; 73(1–2):145–55. PMID: [8577322](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8577322/)
26. Quispe Tintaya KW, Ying X, Dedet JP, Rijal S, De Bolle X, Dujardin JC. Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. The Journal of infectious diseases. 2004; 189(6):1035–43. PMID: [14999607](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14999607/)
27. Van der Auwera G, Ravel C, Verweij JJ, Bart A, Schonian G, Felger I. Evaluation of four single-locus markers for *Leishmania* species discrimination by sequencing. J Clin Microbiol. 2014; 52(4):1098–104. doi: [10.1128/JCM.02936-13](https://doi.org/10.1128/JCM.02936-13) PMID: [24452158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24452158/)
28. Real F, Vidal RO, Carazzolle MF, Mondego JM, Costa GG, Herai RH, et al. The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models.

DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes. 2013; 20 (6):567–81.

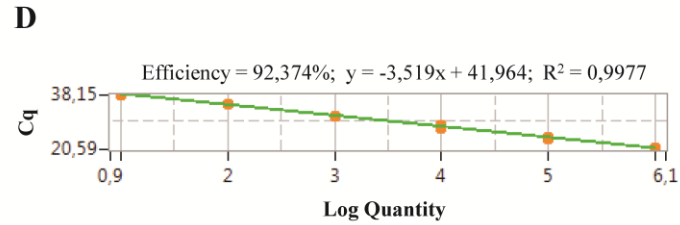
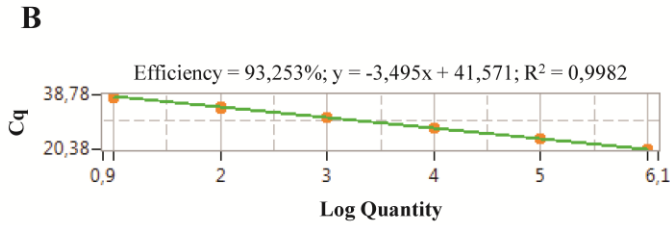
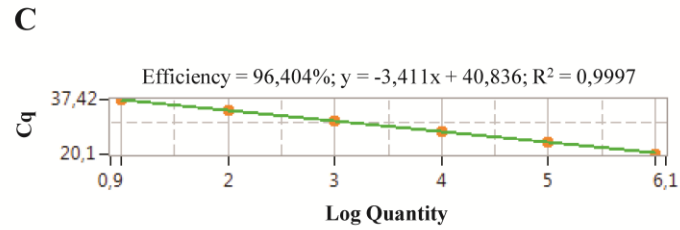
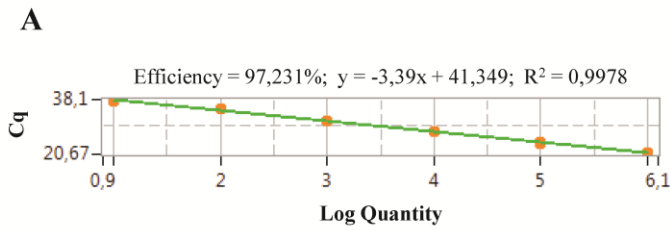
29. Uliana SR, Ishikawa E, Stempliuk VA, de Souza A, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. Geographical distribution of neotropical *Leishmania* of the subgenus *Leishmania* analysed by ribosomal oligonucleotide probes. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000; 94(3):261–4. PMID: [10974994](#)
30. Pratlong F, Lami P, Ravel C, Balard Y, Dereure J, Serres G, et al. Geographical distribution and epidemiological features of Old World *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains. *Parasitology.* 2013; 140(4):423–34. doi: [10.1017/S0031182012001825](#) PMID: [23146283](#)
31. Haralambous C, Antoniou M, Pratlong F, Dedet JP, Soteriadou K. Development of a molecular assay specific for the *Leishmania donovani* complex that discriminates *L. donovani*/*Leishmania infantum* zymodemes: a useful tool for typing MON-1. *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 2008; 60 (1):33–42. PMID: [17889482](#)
32. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan; 41 (Database issue):D36–42. doi: [10.1093/nar/gks1195](#) PMID: [23193287](#)
33. Hall TA 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95–98.
34. Kibbe W.A. 'OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator'. (2007)*Nucleic Acids Res.* 35 (webserver issue): May 25.

Amplicon 2
	5	15	25	35	45	55	65	75
<i>L. (L.) tropica</i>	AGCGCATGGT	GAACGACGCG	ATGAAGTACG	AGGAGGACGA	CAAGGCGCAG	CGCGACCGCG	TGGAGGCAAA	GAACGGCCTG
<i>L. (L.) donovani</i>	AGCGCATGGT	GAACGACGCG	ATGAAGTACG	AGGCGGACGA	CAGGGCGCAG	CGCGACCGCG	TGGAGGCAAA	GAACGGCCTG
<i>L. (L.) i. chagasi</i>	AGCGCATGGT	GAACGACGCG	ATGAAGTACG	AGGCGGACGA	CAGGGCGCAG	CGCGACCGCG	TGGAGGCAAA	GAACGGCCTG
<i>L. (L.) major</i>	AGCGCATGGT	GAACGACGCG	ATGAAGTACG	AGGAGGACGA	CAAGGCACAG	CGCGACCGCG	TGGAGGCAAA	GAACGGCCTG
<i>L. (L.) amazonensis</i>	AGCGCATGGT	GAACGACGCA	ATGAAGTACG	AGGCGGACGA	CAAGGCGCAG	CGCGACCGCG	TGGAGGCAAA	GAACGGTCTG
<i>L. (L.) mexicana</i>	AGCGCATGGT	GAACGACGCA	ATGAAGTACG	AGGCGGACGA	CAAGGCGCAG	CGCGACCGCG	TGGAGGCAAA	GAACGGTCTG
<i>L. (V.) lainsoni</i>	AGCGCATGGT	GAACGATGCG	TCGAAGTACG	AGCAGGCCGA	CAAGATGCAG	CGCGAGCGCG	TGGAGGCGAA	GAACGCTCTG
<i>L. (V.) braziliensis</i>	AGCGCATGGT	GAACGATGCG	TCGAAGTACG	AGCAGGCCGA	CAAGATGCAG	CGCGAGCGCG	TGGAGGCGAA	GAACGGCTCTG
<i>L. (V.) guyanensis</i>	AGCGCATGGT	GAACGATGCG	TCGAAGTACG	AGCAGGCCGA	CAAGATGCAG	CGCGAGCGCG	TGGAGGCGAA	GAACGGTCTG
<i>L. (V.) naiffi</i>	AGCGCATGGT	GAACGATGCG	TCGAAGTACG	AGCAGGCCGA	CAAGATGCAG	CGCGAGCGCG	TGGAGGCGAA	GAACGGCCTG
<i>L. (V.) shawi</i>	AGCGCATGGT	GAACGATGCG	TCGAAGTACG	AGCAGGCCGA	CAAGATGCAG	CGCGAGCGCG	TGGAGGCGAA	GAACGGTCTG
Amplicon 2					
	85	95						
<i>L. (L.) tropica</i>	GAGAACTACG	CGTACTCGAT	GAAG					
<i>L. (L.) donovani</i>	GAGAACTACG	CGTACTCGAT	GAAG					
<i>L. (L.) i. chagasi</i>	GAGAACTACG	CGTACTCGAT	GAAG					
<i>L. (L.) major</i>	GAGAACTACG	CGTACTCGAT	GAAG					
<i>L. (L.) amazonensis</i>	GAGAACTACG	CGTACTCGAT	GAAG					
<i>L. (L.) mexicana</i>	GAGAACTACG	CGTACTCGAT	GAAG					
<i>L. (V.) lainsoni</i>	GAGAACTACG	CGTACTCGAT	GAAG					
<i>L. (V.) braziliensis</i>	GAGAACTACG	CGTACTCGAT	GAAG					
<i>L. (V.) guyanensis</i>	GAGAACTACG	CGTACTCGAT	GAAG					
<i>L. (V.) naiffi</i>	GAGAACTACG	CGTACTCGAT	GAAG					
<i>L. (V.) shawi</i>	GAGAACTACG	CGTACTCGAT	GAAG					

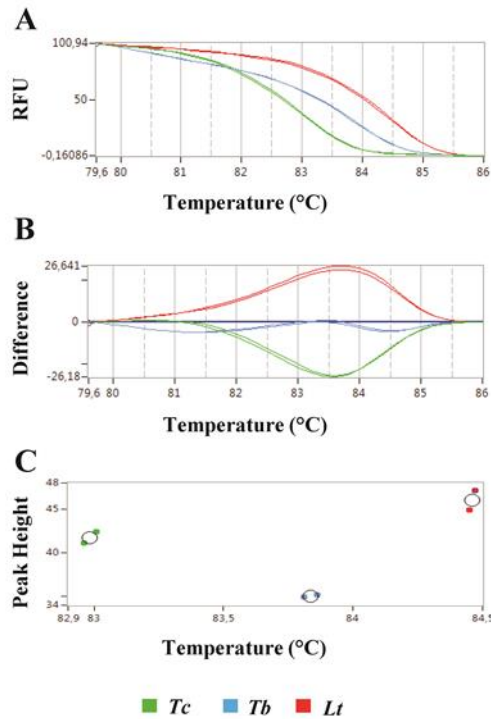
S1 Fig. Nucleotide sequence of hsp70 amplicon 2 and primer localization. The underlined sequences indicate the position of the primers used in real-time PCR assays; the grey boxed nucleotides represent the mutation points found among reference strains of *Leishmania*. The black boxed nucleotides represent mismatches that prevent the annealing of oligonucleotide hsp70F1 to the *L. (Leishmania)* spp. complementary sequence.



S2 Fig. Electrophoretic profile of conventional PCR products of polymorphic regions of the hsp70 gene from reference *Leishmania* species. hsp70 amplicons 1 (A) and hsp70 amplicons 2 (B) were fractionated by electrophoresis in 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. DNA from reference strains of *Leishmania* are named as follows: (Lt): *L. (L.) tropica*; (Ld): *L. (L.) donovani*; (Lc): *L. (L.) infantum chagasi*; (Lj): *L. (L.) major*; (La): *L. (L.) amazonensis*; (Lx): *L. (L.) mexicana*; (Ll): *L. (V.) lainsoni*; (Lb): *L. (V.) braziliensis*; (Lg): *L. (V.) guyanensis*; (Ln): *L. (V.) naiffi* and (Ls): *L. (V.) shawi*. (L): 100 bp DNA ladder and (ntc): no template control, without DNA.



S3 Fig. Efficiency of hsp70 amplicon 1 real-time PCR for DNA from distinct *Leishmania* species. Standard curves were constructed with recombinant plasmids containing amplicon 1 sequence from *L. (L.) amazonensis* (A), *L. (L.) infantum chagasi* (B), *L. (V.) guyanensis* (C) and *L. (V.) lainsoni* (D). The assays used as a template underwent a 10-fold serial dilution representing 1×10^6 to 1×10^1 plasmid copies per reaction and were performed in duplicate.



S4 Fig. HRM plots of hsp70 amplicon 1 from *Trypanosoma*. Representative melting profiles of hsp70 amplicon 1 obtained from the genomic DNA of *T. cruzi* and *T. brucei*. (A): Normalized melting curves; (B): normalized difference curves and (C): dispersion graph of individual plots from *T. cruzi* (*Tc*) and *T. brucei* (*Tb*) compared to *L. (L.) tropica* (*Lt*).

S1 Table – *In silico* analysis of polymorphisms in *hsp70* amplicons 1 and 2. The nucleotide sequences encompassing *hsp70* amplicons 1 and 2 were retrieved in GenBank database. The sequences were aligned and compared with the reference strains sequences determined in this communication (Fig 1) that are not deposited in the bank (a) or in the absence of this, the comparison was done among the deposited sequences of each species (b); incomplete sequences from GenBank (c); not applicable, (N/A).

Species	Strain/Isolate Information	Accession #	Amplicon 1		Amplicon 2	
			Identity Index	Theoretical Tm (°C)	Identity Index	Theoretical Tm (°C)
<i>L. (L.) tropica</i>	MHOM/SU/60/OD	a	N/A	84.1	N/A	N/A
<i>L. (L.) tropica</i>	MHOM/IN/79/DD7	FN395025.1	1.000	84.1	N/A	N/A
<i>L. (L.) tropica</i>	isolate Cat_96 Turkey	KT211405.1	1.000	84.1	N/A	N/A
<i>L. (L.) tropica</i>	isolate Cat_90 Turkey	KT211404.1	1.000	84.1	N/A	N/A
<i>L. (L.) tropica</i>	isolate Cat_89 Turkey	KT211403.1	1.000	84.1	N/A	N/A
<i>L. (L.) tropica</i>	MHOM/EG/90/LPN65	HF586405.1	1.000	84.1	N/A	N/A
<i>L. (L.) tropica</i>	MHOM/MA/88/LEM1314	HF586347.1	1.000	84.1	N/A	N/A
<i>L. (L.) tropica</i>	MHOM/KE/81/NLB_030B	FN395026.1	0.993	84.4	N/A	N/A
<i>L. (L.) tropica</i>	MHOM/YE/86/LEM1015	HF586348.1	0.993	84.4	N/A	N/A
<i>L. (L.) donovani</i>	MHOM/IN/80/DD8	a	N/A	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) donovani</i>	LEM138	JQ990221.1	1.000	84.7	N/A	N/A

<i>L. (L.) donovani</i>	MHOM/IN/1983/AG83	AY702003.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) donovani</i>	MHOM/IN/00/DEVI	FN395028.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) donovani</i>	MHOM/SD/82/Gilani	FN395029.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) donovani</i>	MHOM/SD/68/1S	FN395027.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) donovani</i>	voucher VCRC7 India	KF562071.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) donovani</i>	voucher VCRC4 India	KF562070.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) donovani</i>	voucher VCRC3	KF562069.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) donovani</i>	voucher VCRC2	KF562068.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) donovani</i>	IN/VCRC5	KC884001.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) donovani</i>	Samtse1 Bhutan	JQ730000.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) donovani</i>	Trashigang1 Bhutan	JQ729999.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) donovani</i>	MHOM/IN/1983/AG83	AY702003.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) donovani</i>	MHOM/MA/95/CRE72	HF586352.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) donovani</i>	DD8	AY913842.2	0.944	85.0	N/A	N/A
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	MCER/BR/1981/M6445	a	N/A	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	MHOM/BR/07/ARL	FN395037.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	MHOM/BR/07/WC	FN395036.1	1.000	84.7	N/A	N/A

<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	MCAN/BR/06/MAIKE	FN395035.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) infantum</i>	MHOM/MA/67/IMT-AP263	FN395033.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) infantum</i>	MHOM/PT/00/IMT260	FN395032.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) infantum</i>	MHOM/MT/85/Buck	FN395031.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) infantum</i>	isolate 8. Phlebotomus kandelakii. Georgia	JN676923.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) infantum</i>	isolate 2. Phlebotomus kandelakii. Georgia	JN676922.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) infantum</i>	isolate 4. Phlebotomus balcanicus. Georgia	JN676921.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) infantum</i>	MHOM/ES/90/BCN61	HF586351.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) infantum</i>	MHOM/DZ/94/CRE64	HF586349.1	1.000	84.7	N/A	N/A
<i>L. (L.) infantum</i>	LEM75 /zymodeme 1	X85798.1	0.972	84.1	N/A	N/A
<i>L. (L.) infantum</i>	MCAN/IR/96/LON-49	GQ121006.1	0.875	85.3	N/A	N/A
<i>L. (L.) major</i>	MHOM/IL/81/Friedlin	a	N/A	85.0	N/A	N/A
<i>L. (L.) major</i>	strain L137. Spain	FN395023.1	1.000	85.0	N/A	N/A
<i>L. (L.) major</i>	strain Githure. Kenya	FN395024.1	1.000	85.0	N/A	N/A
<i>L. (L.) major</i>	strain UQ_8. Sudan	FN395022.1	1.000	85.0	N/A	N/A
<i>L. (L.) major</i>	isolate Cat_74. blood. Turkey	KT211401.1	1.000	85.0	N/A	N/A
<i>L. (L.) major</i>	isolate Cat_38. blood. Turkey	KT211400.1	1.000	85.0	N/A	N/A

<i>L. (L.) major</i>	isolate Cat_30. blood. Turkey	KT211399.1	1.000	85.0	N/A	N/A
<i>L. (L.) major</i>	MHOM/SD/2003/LCB33	HF586346.1	1.000	85.0	N/A	N/A
<i>L. (L.) major</i>	MHOM/BF/2004/REN04-8	HF586345.1	1.000	85.0	N/A	N/A
<i>L. (L.) amazonensis</i>	MHOM/BR/1973/M2269	a	N/A	85.0	N/A	N/A
<i>L. (L.) amazonensis</i>	MHOM/BR/73/M2269	EU599090.1	1.000	85.0	N/A	N/A
<i>L. (L.) amazonensis</i>	MHOM/BR/77/LTB0016/C1S1	L14604.1	1.000	85.0	N/A	N/A
<i>L. (L.) amazonensis</i>	MHOM/BR/77/LTB0016/C1S1	L14605.1	1.000	85.0	N/A	N/A
<i>L. (L.) amazonensis</i>	MHOM/CO/82/CELIS	HF586353.1	1.000	85.0	N/A	N/A
<i>L. (L.) mexicana</i>	MNYC/BZ/62/M379	a	N/A	85.0	N/A	N/A
<i>L. (L.) mexicana</i>	MNYC/BZ/62/M379	EU599091.1	1.000	85.0	N/A	N/A
<i>L. (L.) mexicana</i>	MHOM/PE/02/LH2312	FN395038.1	0.986	85.0	N/A	N/A
<i>L. (V.) lainsoni</i>	MHOM/BR/81/M6426	a	N/A	85.0	N/A	82.9
<i>L. (V.) lainsoni</i>	MHOM/BR/1981/M6426	GU071174.1	1.000	85.0	1.000	82.9
<i>L. (V.) lainsoni</i>	MAGO/BR/1983/IM1721	GU071176.1	1.000	85.0	1.000	82.9
<i>L. (V.) lainsoni</i>	MHOM/PE/02/LH2344	FN395049.2	0.979	85.0	1.000	82.9
<i>L. (V.) lainsoni</i>	MHOM/BR/2002/RBO027-P	GU071179.1	0.979	85.0	1.000	82.9
<i>L. (V.) lainsoni</i>	MHOM/PE/03/LC2525	FN395050.1	0.979	85.0	1.000	82.9

<i>L. (V.) lainsoni</i>	MHOM/PE/91/LC1581	FN395048.1	0.979	85.0	1.000	82.9
<i>L. (V.) lainsoni</i>	MHOM/BO/95/CUM71	FN395047.1	0.979	85.0	1.000	82.9
<i>L. (V.) lainsoni</i>	MHOM/BR/2002/NMT-RBO004	GU071187.1	0.972	85.3	1.000	82.9
<i>L. (V.) lainsoni</i>	MCOE/BR/1983/IM1367	GU071182.1	0.993	85.3	1.000	82.9
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903	a	N/A	85.6	N/A	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903	GU071173.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/M2903	M87878.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14621-P clone A	GU368195.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14418-P clone B	GU368205.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2001/NMT-LTCP14369-P clone B	GU368209.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14616-P clone C	GU368194.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2001/RGJ clone B	GU368182.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP14566-P	GU368202.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2006/ICA	GU368201.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14627-P clone B	GU368200.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2001/RGJ clone A	GU368181.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14624-P clone B	GU368198.1	1.000	85.6	1.000	83.3

<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/EMM clone B	GU368180.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/PE/02/LH2182	FN395040.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14440-P clone B	GU368187.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14440-P clone A	GU368186.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/LTCP14432	GU368185.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14515-P	GU368191.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14451-P	GU368190.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14447-P clone B	GU368189.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/LTCP14438	GU368184.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/06/ICA	FN395043.1	1.000	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/EMM clone A	GU368179.1	1.000	85.6	0.990	82.9
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/PE/91/LC2177CL2	EU599088.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP14563-P	GU368210.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2001/NMT-LTCP14369-P clone A	GU368208.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14509-P clone B	GU368207.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14509-P clone A	GU368206.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14418-P clone A	GU368204.1	0.993	85.9	1.000	83.3

<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2001/JOLIVAL	GU368203.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14627-P clone A	GU368199.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14624-P clone A	GU368197.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14621-P clone B	GU368196.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14616-P clone B	GU368193.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14447-P clone A	GU368188.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2001/RGJ clone C	GU368183.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/PE/91/LC2177	FN395042.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BO/94/CUM29	FN395041.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BO/--/CUM180	FN395039.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2000/LTCP1339	GU071186.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/PE/90/FY	HF586372.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/CO/90/LEM2216	HF586371.1	0.993	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/LMG	GU071181.1	0.986	85.6	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BO/90/AN	HF586370.1	c	c	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	IWHI/BR/86/M10187	HF586369.1	c	c	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/PE/--/LH1099	HF586375.1	c	c	1.000	83.3

<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/00/LTB333	HF586404.1	c	c	1.000	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-RBO037	GU071180.1	0.986	85.9	0.962	83.3
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2002/NMT-LTCP 14616-P clone A	GU368192.1	0.986	86.1	0.990	83.7
<i>L. (V.) braziliensis</i>	Boytron	X62485.1	0.986	85.6	0.952	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1975/M4147	a	N/A	85.6	N/A	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/75/M4177	EU599093.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 317P	GU368240.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 316P	GU368239.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 299P	GU368238.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 292G	GU368237.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 292P	GU368236.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 258P	GU368235.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 253P	GU368234.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 248P	GU368233.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 247P	GU368232.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 246P	GU368231.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 243P	GU368230.1	1.000	85.6	1.000	82.9

<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 233P	GU368229.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 223P	GU368228.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 202P	GU368227.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2007/029-ZAV	GU368226.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2007/025-LFA	GU368225.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2007/018-MAS	GU368224.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2007/014-JIS	GU368223.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2007/011	GU368222.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 342P	GU368221.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 328P	GU368220.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 325P	GU368219.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 324P	GU368218.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 308G	GU368217.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 307P	GU368216.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 264P	GU368215.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 210P	GU368214.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 203G clone A	GU368212.1	1.000	85.6	1.000	82.9

<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1975/M4147	GU071172.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/GF/79/LEM85	HF586362.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 203P	GU368211.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/GF/2004/LBC43	HF586361.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/07/029-ZAV	FN395053.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	strain MHOM/GF/85/LEM699	FN395052.1	1.000	85.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1997/NMT-MAO 203G clone B	GU368213.1	1.000	86.6	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/CO/83/REST417	HF586357.1	0.993	85.9	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/PE/02/LH2372	FN395051.1	0.993	85.3	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2002/RBO01	GU071178.1	0.993	85.3	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/GF/2004/GAE1	HF586406.1	c	c	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/EC/90/JUBERLY	HF586360.1	c	c	1.000	82.9
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/EC/90/UI.031	HF586378.1	c	c	1.000	82.9
<i>L. (V.) naiffi</i>	MDAS/BR/1979/M5533	a	N/A	86.1	N/A	83.3
<i>L. (V.) naiffi</i>	MDAS/BR/1979/M5533	GU071183.1	1.000	86.1	1.000	83.3
<i>L. (V.) naiffi</i>	ISQU/BR/1994/IM3936	GU071185.1	0.979	86.4	1.000	83.3
<i>L. (V.) naiffi</i>	MHOM/GF/97/CRE88	HF586373.1	c	c	1.000	83.3

<i>L. (V.) naiffi</i>	MDAS/BR/78/M5210	FN395056.2	c	c	1.000	83.3
<i>L. (V.) naiffi</i>	MHOM/00/94/CRE58	HF586374.1	0.951	85.9	0.981	84.1
<i>L. (V.) naiffi</i>	MHOM/BR/1991/IM3740	GU071184.1	0.958	86.1	0.981	84.1
<i>L. (V.) shawi</i>	MCEB/BR/1984/M8408	a	N/A	86.1	N/A	82.9
<i>L. (V.) shawi</i>	MCEB/BR/1984/M8408	GU071177.1	1.000	86.1	1.000	82.9
<i>L. (V.) shawi</i>	IWHI/BR/1985/IM2326	GU071175.1	0.993	85.9	1.000	82.9
<i>L. (V.) panamensis</i>	MHOM/PA/71/LS94	EU599094.1	b	85.9	1.000	82.9
<i>L. (V.) panamensis</i>	MCHO/PA/00/M4039	FN395055.1	1.000	85.9	1.000	82.9
<i>L. (V.) panamensis</i>	MHOM/PA/--/Ps	HF586367.1	1.000	85.9	1.000	82.9
<i>L. (V.) panamensis</i>	MHOM/PA/--/P7	HF586366.1	1.000	85.9	1.000	82.9
<i>L. (V.) panamensis</i>	MHOM/PA/--/P6	HF586365.1	1.000	85.9	1.000	82.9
<i>L. (V.) panamensis</i>	MHOM/PA/--/P20	HF586364.1	1.000	85.9	1.000	82.9
<i>L. (V.) panamensis</i>	MHOM/PA/--/P1	HF586363.1	1.000	85.9	1.000	82.9
<i>L. (V.) panamensis</i>	MHOM/CR/2004/TIM13	HF586359.1	1.000	85.9	1.000	82.9
<i>L. (V.) peruviana</i>	MHOM/PE/90/LCA08CL2	EU599089.1	b	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) peruviana</i>	MHOM/PE/90/LC468	FN395046.1	1.000	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) peruviana</i>	MHOM/PE/03/LH2439	FN395045.1	1.000	85.9	1.000	83.3

<i>L. (V.) peruviana</i>	MHOM/PE/03/LH2864	FN395044.1	1.000	85.9	1.000	83.3
<i>L. (V.) peruviana</i>	MHOM/PE/89/LH741	HF586368.1	1.000	85.9	1.000	83.3
<i>L. (L.) aethiopica</i>	MHOM/ET/72/L100	FN395021.1	b	84.1	N/A	N/A
<i>L. (L.) aethiopica</i>	MHOM/ET/83/169-83	FN395020.1	1.000	84.1	N/A	N/A
<i>L. (L.) aethiopica</i>	NLB_107-08	FN395019.1	1.000	84.1	N/A	N/A
<i>L. (L.) aethiopica</i>	MHOM/ET/89/GERE	FN395018.1	1.000	84.1	N/A	N/A
<i>L. (L.) martiniquensis</i>	MHOM/TH/2013/LSCM3	KP244368.1	b	84.1	N/A	N/A
<i>L. (L.) martiniquensis</i>	MHOM/TH/2013/LSCM2	KP244367.1	1.000	84.1	N/A	N/A
<i>L. (L.) martiniquensis</i>	MHOM/TH/2012/LSCM1	KP244366.1	1.000	84.1	N/A	N/A
<i>L. (L.) martiniquensis</i>	MHOM/MQ/1992/MAR1	KP244365.1	1.000	84.1	N/A	N/A
<i>Leishmania 'siamensis'</i>	isolate CU1	JX852709.1	b	84.1	N/A	N/A
<i>Leishmania 'siamensis'</i>	isolate PCM5	KC202881.1	1.000	84.1	N/A	N/A
<i>Leishmania 'siamensis'</i>	isolate PCM4	KC202882.1	1.000	84.1	N/A	N/A
<i>Leishmania 'siamensis'</i>	isolate CU1	KC202883.1	1.000	84.1	N/A	N/A
<i>Leishmania 'siamensis'</i>	isolate 4-2	JX852708.1	0.993	83.9	N/A	N/A
<i>Leishmania 'siamensis'</i>	isolate PCM2	KC202880.1	0.910	83.3	N/A	N/A