



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL



Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

CARTA PATENTE N.º PI 0004507-1

Patente de Invenção

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito : PI 0004507-1

(22) Data do Depósito : 28/09/2000

(43) Data da Publicação do Pedido : 30/04/2002

(51) Classificação Internacional : C12Q 1/68; C12R 1/90

(54) Título : MÉTODO E KIT PARA A DIFERENCIAÇÃO DE LEISHMANIA (VIANNIA) DE LEISHMANIA (LEISHMANIA), CAUSADORAS DE LEISHMANIOSE, POR PCR-RFLP

(73) Titular : Fundação Oswaldo Cruz. Endereço: Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil (BR/RJ), CEP: 21045-900.; Universidade Federal de Minas Gerais. Endereço: Av. Antonio Carlos, 6627 Reitoria - 7º andar/sala 7005 - CT&IT 31270-901 Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (BR/MG).

(72) Inventor : Álvaro José Romanha, Bioquímico(a). Endereço: Rua Xavier de Gouveia 157, apto. 202, Grajaú, Brasil.; Ângela Cristina Volpini, Bióloga. Endereço: Rua Adolfo Pereira 95, apto. 502 Anchieta, Minas Gerais, Brasil.; Valéria Maria de Azeredo Passos, Médica. Endereço: Rua Lavras 547, apto. 102 São Pedro, Minas Gerais, Brasil.; Guilherme Corrêa Oliveira, Biólogo(a). Endereço: Rua Iracy Manata 33, apto. 103 Buritis, Minas Gerais, Brasil.

Prazo de Validade : 10 (dez) anos contados a partir de 26/11/2013, observadas as condições legais.

Expedida em : 26 de Novembro de 2013.

Assinado digitalmente por
Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patentes

15 de Novembro
REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
de 1889

"MÉTODO E KIT PARA A DIFERENCIAÇÃO DE *Leishmania* (Viannia) de *Leishmania* (*Leishmania*), CAUSADORAS DE LEISHMANIOSE, POR PCR-RFLP"

A presente invenção se relaciona com a
5 diferenciação molecular das espécies de parasitos *Leishmania* (*Viannia*) de *L.* (*Leishmania*), mais particularmente dos subgêneros das espécies *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e/ou *L.* (*V.*) *guyanensis* de *L.* (*Leishmania*) *amazonensis*, através da Reação em Cadeia
10 da Polimerase aliada à técnica de análise do Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição ("Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism" - PCR-RFLP).

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

15 O combate à leishmaniose é considerado pela Organização Mundial da Saúde como uma das grandes prioridades. Estima-se que, em todo o mundo, 12 milhões de pessoas estejam infectadas e que cerca de 350 milhões encontrem-se em áreas de risco de contrair a
20 doença, dos quais 1,5 a 2 milhões serão provavelmente infectados (World Health Organization. 1995. Tropical Disease Research. Twelfth Programme Report. World Health Organization. Geneva. Switzerland). A *Leishmania* é um protozoário parasita pertencente à ordem
25 *Kinetoplastida* e é de particular complexidade. Até o momento já foram identificadas aproximadamente 20 diferentes espécies de *Leishmania* que causam doenças em humanos, que vão desde lesões cutâneas até graves infecções sistêmicas. O combate à disseminação da

doença passa necessariamente pela identificação da *Leishmania* no vetor, no reservatório animal e nos pacientes humanos.

Muitas têm sido as pesquisas no sentido de
5 distinguir a espécie particular de *Leishmania*, pois
essa medida contribui para a escolha do tratamento a
ser administrado ao indivíduo infectado. Os métodos
tradicionais baseiam-se na identificação das formas
amastigotas presentes em amostras de tecido e em
10 material retirado das lesões, em combinação com testes
dérmicos de hipersensibilidade do tipo retardado
utilizando um antígeno com promastigotas mortas. Apesar
de simples e razoavelmente sensível, o teste
intradérmico é para aferir a resposta imune e não
15 determina se as infecções são ativas ou inativas. Da
mesma forma, o exame direto ao microscópio das formas
amastigotas não distingue a espécie e a sua
sensibilidade é de somente 60 a 65%.

No que se refere à Leishmaniose Tegumentar
20 Americana (LTA) no Brasil, as principais espécies
responsáveis pela doença são *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* que estão distribuídas por todo o
Brasil e *L. (V.) guyanensis*, restrita à região
amazônica. Os critérios clínicos não conseguem
25 diferenciar especificamente qual o agente causador da
doença, já que as manifestações clínicas são, na
maioria dos casos, semelhantes. Entretanto, a *L. (V.) braziliensis* é a espécie que desenvolve as lesões mais
graves e que está frequentemente associada à invasão de

mucosa, exigindo um tratamento mais intenso, com maior quantidade de antimonial pentavalente do que o utilizado no caso da *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. Apesar de *L. (L.) amazonensis* estar associada a formas clínicas mais brandas, é a única espécie caracterizada na leishmaniose difusa, uma forma rara, anérgica, da LTA e que não responde ao tratamento. A *L. (V.) guyanensis* está restrita ao norte da bacia Amazônica, causa lesões pouco dolorosas e múltiplas e não requer um esquema de tratamento mais intenso. A distinção entre as espécies é também fundamental nos estudos epidemiológicos da LTA, já que não são conhecidos os reservatórios animais da *L. (V.) braziliensis* e poucas espécies de flebotomíneos têm sido consideradas como vetores da doença nas diferentes regiões do Brasil.

Além dos ensaios bioquímicos, o aperfeiçoamento das técnicas baseadas na caracterização do DNA tem se constituído em uma das formas mais exploradas para distinguir as espécies de *Leishmania*. A PCR se mostrou uma boa alternativa para a detecção do parasito em espécimes clínicos humanos (biópsias e sangue) e em animais (vetores e reservatórios) com LTA. Contudo, a PCR não caracteriza a espécie do parasito detectado, o que exige a posterior utilização de técnicas trabalhosas e caras, tal como a hibridação com sondas moleculares ou o crescimento e o isolamento do parasito em cultura para posterior caracterização por isoenzimas ou anticorpos monoclonais.

Em *Leishmania*, o DNA cinetoplástico (kDNA) ou DNA mitocondrial forma uma rede compacta de minicírculos e maxicírculos conectados, os quais têm cerca de 850 e 3.100 pares de bases (pb), respectivamente. Os minicírculos possuem duas regiões, uma de aproximadamente 150-200pb com grande homologia de nucleotídeos entre as espécies de *Leishmania*, conhecida como região conservada. A outra região é denominada região variável, que tem tamanhos entre 650-800pb, dependendo da espécie. A sequência de nucleotídeos da região variável apresenta um alto grau de heterogeneidade não só entre cepas e isolados, como também entre minicírculos de um mesmo parasito. Essa característica tem sido a base dos desenvolvimentos mais recentes na técnica de identificação das espécies de *Leishmania* (vide Kapoor, G.S., Arora, S.K. e Sehgal, S. 1998. "Genetic polymorphism of *Leishmania* species using kinetoplast DNA restriction fragment length polymorphism and cDNA probe of *Leishmania donovani*". Med. Microbiol. Immunol. 186: 209-214).

A análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) foi também uma das técnicas utilizadas na tentativa de caracterização específica de *Leishmania*, a partir do kDNA de parasitos isolados em cultura (Lopes, U.G., Momem, H., Grimaldi, Jr. G., Marzochi, M.C.A., Pacheco, R.S. e Morel, C.M. 1984. "Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis". J. Parasitol. 70(1): 89-98).

Entretanto, o isolamento em cultura é demorado (1 a 2 meses), e apresenta baixa sensibilidade (cerca de 30%) (ver Rodriguez, N., Guzman, B., Rodas, A., Takiff, H., Bloom, B.R. e Convit J. 1994. "Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization". J. Clin. Microbiol. 32(9): 2246-2252). Posteriormente, a associação da técnica de PCR com a RFLP significou a perspectiva de ultrapassar as limitações dessas técnicas quando aplicadas isoladamente. No caso de *Leishmania*, inicialmente foi amplificado o minicírculo do kDNA inteiro (aproximadamente 850 pb) ou a sua região variável (cerca de 650 pb), seguindo-se, então, a digestão enzimática dos produtos de PCR. No entanto, os produtos de digestão do minicírculo inteiro ou da sua região variável resultaram em perfis complexos e variáveis, não permitindo ainda uma distinção inequívoca entre as espécies (ver Noyes, H.A., Reyburn, H., Bailey, J.W. e Smith, D. 1998. "A nested-PCR-based Schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle class directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan". J. Clin. Microbiol. 36(10): 2877-2881).

25 Dessa forma, fica evidente a necessidade de um método rápido, eficaz e de custo razoável para detectar e diferenciar *L. (V.) de L. (L.)*, mais particularmente, *L. (V.) braziliensis* e/ou *L. (V.) guyanensis* de *L. (L.) amazonensis*. Para atingirmos tal objetivo, mantivemos

como alvo de amplificação e digestão o kDNA, só que, ao invés de utilizarmos o minicírculo total ou sua região variável, utilizamos a região conservada.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

5 O objetivo da presente invenção é a diferenciação molecular das espécies de parasitos *Leishmania* (*Viannia*) de *L. (Leishmania)*, mais particularmente dos subgêneros das espécies *L. (V.) braziliensis* e/ou *L. (V.) guyanensis* de *L. (L.) amazonensis* através de
10 PCR-RFLP.

Uma primeira concretização da presente invenção diz respeito a um método de diferenciação entre essas duas espécies de *Leishmania* através da amplificação por PCR da região conservada do minicírculo do kDNA de
15 *Leishmania* seguida de clivagem dos produtos da PCR com uma enzima de restrição específica, separação dos produtos por eletroforese e análise dos fragmentos gerados por técnica apropriada, por exemplo, RFLP. O método da presente invenção se caracteriza pelas etapas
20 de:

- (a) extração do DNA da amostra a ser examinada;
- (b) amplificação através da PCR, em condições apropriadas, do DNA da região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania*, utilizando
25 iniciadores específicos;
- (c) digestão dos produtos de amplificação da etapa (b) com uma enzima de restrição específica cuja ação sobre esse produto é seletiva em

relação à espécie de *Leishmania* presente na amostra e;

- (d) separação dos produtos de digestão da etapa (c) por eletroforese e análise da migração das bandas geradas, isto é, o tamanho dos fragmentos de DNA obtidos.

Numa segunda concretização, a invenção é dirigida a kit diagnóstico a ser utilizado no método de diferenciação entre espécies de parasitos *Leishmania* (Viannia) de *L. (Leishmania)*, mais particularmente, dos subgêneros *L. (V.) braziliensis* e/ou *L. (V.) guyanensis* de *L. (L.) amazonensis* da presente invenção. Um kit básico compreende todos os reagentes necessários para a realização da técnica de PCR, a saber: iniciadores específicos, nucleotídeos, tampão de reação. O kit contém, ainda, a enzima *Taq* polimerase, por exemplo, óleo mineral, diluente de amostra para eletroforese, DNA de cepas referência das espécies *Leishmania* (Viannia) e *L. (Leishmania)*, mais particularmente, dos subgêneros das espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* para servirem de padrão, um protocolo e um manual para instruir o usuário.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIGURA 1 mostra os sítios de restrição das enzimas de restrição nas regiões conservadas do minicírculo do kDNA de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, sendo que as enzimas espécie-específicas estão marcadas em negrito.

FIGURA 2 mostra o resultado da aplicação do método da presente invenção através do perfil de restrição dos produtos de PCR da região conservada do minicírculo do kDNA de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*,
5 antes e após a digestão com a endonuclease Hae III.

FIGURA 3 mostra o resultado da aplicação do método da presente invenção através do perfil de restrição dos produtos de PCR da região conservada do minicírculo do kDNA de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e
10 *L. (V.) guyanensis* após a digestão com a endonuclease Hae III. Os resultados mostram que *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* são indistinguíveis, uma vez que pertencem ao mesmo subgênero, entretanto, ambas se diferenciam de *L. (L.) amazonensis*.

15 **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

Para facilitar a compreensão, são dadas a seguir as definições já consagradas de alguns dos termos usados na descrição da invenção:

(1) Iniciadores (primers): oligonucleotídeos de
20 fita única ou fragmentos de DNA que hibridizam com fitas opostas de um segmento de DNA e onde a DNA polimerase inicia a síntese.

(2) Par de iniciadores: dois iniciadores,
25 incluindo iniciador 1 que hibridiza com a fita única de uma extremidade da sequência de DNA a ser amplificada e iniciador 2 que hibridiza com a outra extremidade localizada

na fita complementar da sequência de DNA a ser amplificada.

- 5 (3) Reação em cadeia de polimerase (PCR): técnica na qual são aplicados ciclos de desnaturação, anelamento com o iniciador e extensão com uma polimerase de DNA, por exemplo a *Taq* DNA polimerase, para amplificar um número de cópias de uma sequência alvo de DNA. O processo PCR de amplificação de ácido nucleico está descrito nos documentos 10 US4.683.195 e US4.683.202.
- (4) Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição - RFLP: variação, entre indivíduos, no tamanho dos fragmentos oriundos do mesmo 15 local cromossômico. O polimorfismo de restrição é independente da função do gene.
- (5) Enzima de restrição: enzimas que são capazes de clivar as fitas de DNA em sítios específicos através do reconhecimento de 20 pequenas sequências nucleotídicas específicas do DNA. Elas são componentes essenciais dos métodos usados na construção dos mapas genéticos.
- 25 (6) Minicírculos: pequenas moléculas de DNA circular, com cerca de 850 pb, encontradas nos cinetoplastos das leishmanias e que contém a região conservada (120 a 150 pb) que pode ser usada na amplificação por PCR.

O objetivo da presente invenção é alcançado pela amplificação, por PCR, da região conservada do minicírculo do kDNA das espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e digestão dos
5 produtos com uma enzima de restrição específica. Foi verificado que através da aplicação dessa técnica foram obtidos perfis distintos de restrição, o que significa que o método é capaz de distinguir os subgêneros *Viannia* e *Leishmania* das principais espécies causadoras
10 de leishmaniose, em especial LTA no Brasil.

O DNA dos minicírculos é obtido através de técnicas conhecidas pelos especialistas no assunto. Por exemplo, a fonte do DNA dos controles positivos pode ser a fase líquida obtida da centrifugação dos
15 parasitas de fase estacionária de cepas de referência das espécies de *Leishmania*, após lise a quente. Da mesma forma, a fonte do DNA dos espécimes clínicos pode ser a fase líquida dos lisados digeridos de tecido de pacientes (ver Passos, V.M.A., Fernandes, O., Lacerda,
20 P.A.F., Volpini, A.C., Gontijo, C.M.F., Degraive, W. e Romanha, A.J. 1999. "*Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil". Acta Tropica. 72: 251-258).

25 A amplificação da região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania* é feita por PCR com os iniciadores definidos na Tabela 1 (Passos et al. 1999) ou seqüências nucleotídicas funcionalmente equivalentes, ou seja, que sejam capazes de amplificar

a região conservada do minicírculo do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania*. A técnica de PCR é conhecida daqueles versados no assunto. Além das metodologias de uso geral descritas nos documentos US 4 683 195 e US 4 683 202, também podem ser citados na aplicação específica de caracterização das espécies de *Leishmania*, Passos et al (1999); Noyes et al (1998); Rodriguez et al (1994) e Hernandez-Montes et al (Hernandez-Montes, O., Monroy-Ostria A., McCann, S. e Barker, D.C. 1998. "Identification of Mexican *Leishmania* species by analysis of PCR amplified DNA". Acta Tropica. 71: 139-153). Na presente invenção está sendo utilizada preferencialmente a metodologia descrita por Passos et al (1999).

Tabela 1: Iniciadores utilizados na reação de PCR para amplificação da região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania*.

ID SEQ	Iniciadores
1	5'-GGG (G/T) AGGGGCGTTCT (G/C) CGAA-3'
2	5'-(G/C) (G/C) (G/C) (A/C) CTAT (A/T) TTACACCAACCCC-3'

Apesar de amplamente conhecida na caracterização de DNA e nas técnicas empregadas em biologia molecular, a etapa de digestão enzimática é muito importante para o êxito da presente invenção. A escolha da enzima de

restrição exigiu um estudo da presença de sítios de restrição nas seqüências da região conservada do minicírculo do kDNA de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* depositadas no GeneBank sob N^{os} de acesso: U19803, X54471 e M21325, respectivamente. O resultado desse estudo é apresentado na Figura 1. Uma vez que a região conservada do minicírculo de *L. (V.) guyanensis* é 98% similar à seqüência de *L. (V.) braziliensis*, e esta última é a espécie mais distribuída pelo país e a que causa as lesões mais graves, optamos por trabalhar com a seqüência de *L. (V.) braziliensis*. Adicionalmente, as diferenças de seqüência entre *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* (2%) não são nos sítios de restrição de nenhuma das enzimas. Foram encontradas 22 enzimas com sítios de restrição nas seqüências das regiões conservadas do minicírculo do kDNA das espécies de *Leishmania* estudadas. Oito enzimas foram específicas para *L. (V.) braziliensis* e/ou para *L. (V.) guyanensis* e 10 para *L. (L.) amazonensis*, sendo, portanto consideradas candidatas com relação à especificidade do método da presente invenção. Em análise posterior, com base no tamanho dos produtos de PCR gerados após a digestão, esse número foi reduzido para 7 enzimas específicas para *L. (V.) braziliensis* e/ou para *L. (V.) guyanensis* e 6 para *L. (L.) amazonensis*. A Tabela 2 mostra as enzimas de restrição e os fragmentos esperados da digestão dos produtos de amplificação por

PCR da região conservada do minicírculo do kDNA das três espécies de *Leishmania*.

Tabela 2: Enzimas de restrição específicas e os fragmentos esperados da digestão da região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania*

Enzimas	Fragmentos esperados (pb)	
	<i>L. (V.) braziliensis</i> e/ou <i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>
ApaI I	88 + 32	-
Bsl I	29 + 91	-
BsiHKA I ou Bsp I 1286I	92 + 28	-
Hae I ou Hae III	40 + 8 00	-
MnlI	91 + 29	-
Aci I	-	83 + 37
Apo I	-	69 + 51
Apo I ou EcoR I	-	60 + 60
Ava I	-	78 + 42
Bsg I	-	54 + 66
Taq II	-	20 + 100

Como observado na Tabela 2, a utilização das enzimas específicas para *L. (V.) braziliensis* e/ou *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* na digestão dos produtos da amplificação por PCR da região conservada do minicírculo do kDNA dessas espécies permite estabelecer a sua diferenciação através da eletroforese dos fragmentos em gel de poliacrilamida e sua visualização por coloração com a prata.

Numa opção preferencial, sem excluir as demais enzimas (Tabela 2) utilizamos a enzima de restrição Hae III na etapa de digestão por gerar um perfil simples e de fácil distinção. Além disso é uma enzima de fácil aquisição no mercado nacional, de baixo custo e boa

estabilidade O produto amplificado da região conservada do minicírculo do kDNA de *L. Viannia*, mais particularmente, de *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* digerido gera dois fragmentos, um de 40 e
 5 outro de 80pb. No entanto, o resultado da digestão do produto amplificado da região conservada do minicírculo do kDNA de de *L. Leishmania*, mais particularmente, *L. (L.) amazonensis*, com a mesma enzima de restrição, mostra que não há clivagem do fragmento de 120 pb.

10 O kit da presente invenção inclui todos os reagentes necessários para permitir a diferenciação entre as espécies de *L. (Viannia)* e *L. (Leishmania)*, mais particularmente, das espécies *L. (V.) braziliensis* e/ou *L. (V.) guyanensis* de *L. (L.) amazonensis* pelo
 15 método descrito acima. O kit consiste de iniciadores específicos para a região conservada do minicírculo do kDNA dessas três espécies de *Leishmania* como mostrado na Tabela 1 e, adicionalmente, são fornecidos reagentes e aditivos normalmente utilizados na técnica de PCR,
 20 como por exemplo, nucleotídeos apropriados, tais como dGTP (desoxiguanidina-trifosfato), dATP (desoxiadenosina-trifosfato), dCTP (desoxicitidina-trifosfato), e dTTP (desoxitimidina-trifosfato); solução tampão apropriada (por exemplo, 10mM de Tris-
 25 HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, pH 8,5); Taq DNA polimerase; enzima de restrição para digerir os produtos da PCR e seu tampão adequado e DNA de cepas referência das espécies de *L. (Viannia)* e *L. (Leishmania)*, mais particularmente, das espécies *L.*

(V.) *braziliensis*, L. (V.) *guyanensis* e L. (L.) *amazonensis*, para servirem de padrão. Será fornecido um manual de instruções contendo protocolo a ser utilizado no teste, com uma figura ilustrativa dos resultados esperados.

A presente invenção é descrita detalhadamente através dos exemplos apresentados abaixo. É necessário frisar que a invenção não está limitada a esses exemplos mas que também inclui variações e modificações dentro dos limites nos quais ela funciona.

EXEMPLO 1

Extração do DNA, como descrito em Passos et al. (1999):

Os parasitas das cepas de referência de *Leishmania* foram colhidos por centrifugação de 1 ml de cultura na fase estacionária, lavados em PBS (tampão fosfato salino pH 7,2-7,4), ressuspensos em 50 µl de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), fervidos por 15 minutos e submetidos a uma nova centrifugação. A fase líquida é coletada e estocada a -20°C para uso como fonte de DNA para os controles positivos.

Os lisados de tecido foram obtidos a partir de fragmentos de biópsias de pacientes, previamente congelados, pela adição de 25 µl de TE, 100 µg/ml de proteinase K (concentração final) e incubados a 56°C por 3 horas, com homogeneização a cada 30 min. O lisado digerido foi mantido em ebulição por 15 minutos, centrifugado e a fase líquida usada como fonte de DNA.

EXEMPLO 2

Amplificação pela PCR utilizando os iniciadores específicos constantes da Tabela 1, como descrito em Passos et al. (1999), com pequenas modificações:

- 5 A mistura de reação consiste de: 200 μ M de cada dNTP (desoxinucleotídeo-trifosfato: dGTP (desoxiguanidina-trifosfato), dATP (desoxiadenosina-trifosfato), dCTP (desoxicitidina-trifosfato), dTTP (desoxitimidina-trifosfato) 1 μ M de cada iniciador,
- 10 solução tampão (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase e 1 μ l de amostra de DNA em um volume final de 10 μ l e 20 μ l de óleo mineral para evitar evaporação. As condições de PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 34
- 15 ciclos a 94°C por 1 minuto, a 55°C por 1 minuto, a 72°C por 30 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os controles positivos contendo DNA das cepas de referência de *L. (V.) braziliensis* (cepa MHOM/BR/75/M2903 e cepa MCAN/BR/73/BH348) e *L. (L.) amazonensis* (cepa IFLA/BR/67/PH8 e cepa MHOM/BR/73/M2269) e um controle negativo (sem DNA)
- 20 fizeram parte de cada grupo de reação. Foi obtido um único produto PCR de 120 pb para cada reação.

- O controle negativo foi um tubo de reação contendo
- 25 todos os reagentes necessários à amplificação sem adição de DNA molde. Este controle permite a detecção de contaminação da reação de PCR que, quando ocorre, leva a resultados falso-positivos. Outros cuidados, além dos controles internos da reação, são necessários

quando trabalhamos com técnicas com alta sensibilidade como é o caso da PCR, principalmente tendo como alvo o kDNA. São necessários ambientes físicos separados: 1) para a extração de DNA; 2) para a mistura inicial dos reagentes básicos (tampão, iniciadores, dNTP e Taq DNA polimerase) e 3) para amplificação, digestão e eletroforese dos produtos digeridos. Utilizar material plástico novo e estéril, separar um conjunto de pipetas para a mistura dos reagentes básicos e uma capela de fluxo laminar para preparar a mistura básica. Utilizar preferencialmente ponteiras com barreira para proteger contra contaminação por aerosol.

EXEMPLO 3

Digestão enzimática dos produtos de amplificação pela PCR obtidos no Exemplo 2:

A digestão dos produtos PCR das amplificações da região conservada do minicírculo do kDNA dos controles positivos e do material obtido dos pacientes foi feita a 37°C por 3 horas, utilizando 3 µl de cada produto PCR com 1 U da enzima selecionada daquelas listadas na Tabela 2 e tampão em volume final de 10 µl de reação. A visualização dos produtos da digestão (5 µl) foi feita em géis de poliacrilamida a 12% após coloração com a prata.

A Figura 2 mostra o perfil de restrição dos produtos de PCR da região conservada do minicírculo do kDNA de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* gerados após digestão enzimática. No gel, a canaleta M

corresponde ao marcador de tamanho molecular pUC18 digerido pela enzima Msp I; as canaletas 1 a 6 correspondem respectivamente aos produtos antes da digestão: cepas referência de *L. (L.) amazonensis* 1- IFLA/BR/67/PH8; 2- MHOM/BR/73/M2269; 3- paciente com 5 LTA; cepas referência de *L. (V.) braziliensis* 4- MHOM/BR/75/M2903; 5- MCAN/BR/73/BH348; 6- paciente com LTA. As canaletas 1'a 6' correspondem aos mesmos produtos após digestão. A canaleta N- corresponde ao 10 controle negativo da reação sem adição de DNA.

EXEMPLO 4

O mesmo procedimento utilizado nos exemplos anteriores, incluindo todas as etapas e condições, foi aplicado para incluir a espécie *L. (V.) guyanensis*.

15 A Figura 3 mostra o perfil de restrição do produto de PCR da região conservada do minicírculo do kDNA de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) guyanensis* gerado após digestão enzimática com a enzima de restrição Hae III. No gel, M significa o 20 marcador de tamanho molecular 25pb Ladder; as canaletas 1 a 6 correspondem respectivamente aos produtos após a digestão para: cepas referência de *L. (L.) amazonensis* 1- IFLA/BR/67/PH8 e 2- MHOM/BR/73/M2269; cepas referência de *L. (V.) braziliensis* 3- MHOM/BR/75/M2903 25 e 4- MCAN/BR/73/BH348; cepas referência de *L. (V.) guyanensis* 5- MHOM/BR/70/M1176 e 6- MHOM/BR/75/M4147; N- controle da reação sem adição de DNA

EXEMPLO 5

A validação da PCR-RFLP como método de diferenciação de subgêneros de *Leishmania* foi feita utilizando-se 60 amostras de *L. (V.) braziliensis* e 6
5 de *L. (L.) amazonensis*, obtidas de cultura (n=8) e/ou tecidos de pacientes (n=58), caracterizadas previamente por hibridação com sondas moleculares marcadas radioativamente. Os procedimentos de hibridação foram aqueles descritos em Passos et al (1999) (loc. Cit.) e
10 Passos et al (1997) (Passos, V.M.A., Fernandes, O., Gontijo, B.A., Lacerda, P.A.F., Volpini, A.C., Catanho, M., Mayrink, W. e Romanha, A.J. 1997. "American Tegumentary Leshmaniasis in Rio Doce Valley, state of Minas Gerais, Brazil: molecular characterization of
15 *Leishmania* parasites". Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 92(suppl. I): 201). Os resultados da caracterização de *Leishmania* sp. por PCR-RFLP, comparado à hibridação em estudo cego, estão na Tabela 3.

A concordância observada entre a PCR-RFLP e a
20 hibridação com sondas radioativas foi de 97%, Kappa 84,00% + 12,21 (excelente). Apenas uma amostra (#18) apresentou um padrão diferente daquele obtido com a hibridação. Duas amostras (#11 e 65) que à hibridação com sonda radioativa apresentaram resultado dúbio como
25 *L. (Leishmania)* ou *L. (Viannia)*, à PCR-RFLP foram caracterizadas unicamente como *L. (Viannia)*. As amostras #33 e 36, pela pequena disponibilidade de produto amplificado, não foram positivas à sonda radioativa. A obtenção de maior quantidade de produto

amplificado permitiu a caracterização por PCR-RFLP. As amostras de tecido dos pacientes com outras dermatoses que não LTA (#71-74), apresentaram-se negativas para *Leishmania* em ambos os métodos. As amostras de *Trypanosoma cruzi* de diferentes zimodemas (#75-79), foram negativas à hibridação e apresentaram perfis multibanda à PCR-RFLP. Entretanto, tais perfis foram distintos daqueles de *Leishmania*.

Tabela 3 - Resultado da caracterização de *Leishmania* sp. por PCR-RFLP comparado à hibridação em estudo cego.

Material	Origem	Hibridação	PCR-RFLP
01. V1	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
02. V4	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
03. V5	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
04. V7	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
05. V9	IFLA/BR/67/PH8	L. Leishmania	L. Leishmania
06. V12	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
07. V14	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
08. V15	IFLA/BR/67/PH8	L. Leishmania	L. Leishmania
09. V17	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
10. V18	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
11. V20	Tecido	Viannia/Leishmania ⁺	L. Viannia
12. V21	MHOM/BR/75/M4147	L. Viannia	L. Viannia
13. V24	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
14. V25	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
15. V26	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
16. V29	Tecido	L. Leishmania	L. Leishmania
17. 2v	Tecido	L. Leishmania	L. Leishmania
18. 3v	Cultura	L. Viannia	L. Viannia
19. 7v	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
20. 8v	Cultura	L. Viannia	L. Viannia
21. 9v	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
22. 10v	Cultura	L. Viannia	L. Viannia
23. 13v	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
24. 15v	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
25. 16v	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
26. 17v	IFLA/BR/67/PH8	L. Leishmania	L. Leishmania

Material	Origem	Hibridação	PCR-RFLP
27. 18v	MNYC/BZ/62/M379	L. Leishmania	L. Leishmania
28. 34v	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
29. 03	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
30. 06	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
31. 07	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
32. 08	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
33. 11	Tecido	ND	L. Viannia
34. 12	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
35. 13	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
36. 23	Tecido	ND	L. Viannia
37. 26	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
38. 29	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
39. 30	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
40. 35	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
41. 38	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
42. 60	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
43. 62	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
44. 64	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
45. 67	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
46. 71	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
47. 75	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
48. 77	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
49. 85	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
50. 86	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
51. 90	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
52. 95	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
53. 97	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
54. 99	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
55. 102	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
56. 103	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
57. 104	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
58. 105	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
59. 114	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
60. 116	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
61. 120	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
62. 123	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
63. 130	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
64. 132	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
65. 133	Tecido	Viannia/Leishmania ⁺	L. Viannia
66. 135	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
67. 136	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
68. 142	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
69. 144	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
70. 146	Tecido	L. Viannia	L. Viannia
71. V3	Tecido*	NA	NA
72. V16	Tecido*	NA	NA
73. V27	Tecido*	NA	NA
74. V30	Tecido*	NA	NA

Material	Origem	Hibridação	PCR-RFLP
75. V6	T. CRUZI 298/RS22	Negativa	MB
76. V13	T. CRUZI 304/229A	Negativa	MB
77. V19	T. CRUZI 203/GA22	Negativa	MB
78. V23	T. CRUZI 203/GA22	Negativa	MB
79. V28	T. CRUZI 300/231	Negativa	MB

IFLA/BR/67/PH8=L. (L.) amazonensis;

MHOM/BR/75/M4147=L. (V.) guyanensis; MNYC/BZ/62/M379 =

L. (L.) mexicana; ND = não determinado; NA = não se

aplica, uma vez que não ocorreu amplificação para a

5 hibridação nem para a digestão; MB = perfil multi-

bandas distinto de L. (V.) braziliensis e de L. (L.)

amazonensis; * = tecidos de pele de pacientes com

outras dermatoses que não LTA; + = hibridação com ambas

as sondas de L. (Viannia) e de L. (Leishmania). Em

10 negrito está marcada a única amostra discordante entre

a hibridização e PCR-RFLP.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIAS

1) INFORMAÇÕES GERAIS:

5 I.a) Requerente: Fundação Oswaldo Cruz & Universidade
Federal de Minas Gerais
I.b) Endereço: Av. Brasil, 4365, Castelo Mourisco, sala
05, Manguinhos - 21045-900 - Rio de Janeiro - RJ &
Avenida Antônio Carlos 6627 - Reitoria- 7º andar - sala
10 7005 - 31270-901 - Belo Horizonte - MG.

II) Título da Invenção: "MÉTODO E KIT PARA A
DIFERENCIAÇÃO DE *Leishmania* (Viannia) de *Leishmania*
(*Leishmania*), causadoras de Leishmaniose, POR PCR-
15 RFLP".

III) Número de Seqüências: 2 (duas).

IV) Formato para leitura em computador:
20 IV.a) Meio utilizado: disquete de 3,5 polegadas.
IV.b) Computador utilizado: compatível com IBM PC.
IV.c) Sistema operacional: PC-DOS/MS-DOS.

2) INFORMAÇÕES GERAIS DAS SEQÜÊNCIAS:

25

I.a) Número identificador da seqüência: ID SEQ 1

II) Características da seqüência:

II.a) tamanho: 20
30 II.b) tipo: ácido nucléico
II.c) conformação da fita: fita única
II.d) topologia: linear F (Forward)

III) Posição no genoma:

35 III.a) posição no mapa: DNA da região conservada do
minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) de

Leishmania.

GGG (G/T) AGGGGCGTTCT (G/C) CGAA

5 I.a) Número identificador da sequência: ID SEQ 2

II) Características da sequência:

II.a) tamanho: 22

II.b) tipo: ácido nucléico

10 II.c) conformação da fita: fita única

II.d) topologia: linear R (Reverse)

III) Posição no genoma:

15 III.a) posição no mapa: DNA da região conservada do
minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) de
Leishmania.

(G/C) (G/C) (G/C) (A/C) CTAT (A/T) TTACACCAACCCC

REIVINDICAÇÕES

1. Método de diferenciação de *Leishmania* (*Viannia*) de *Leishmania* (*Leishmania*) por PCR que é realizado pelas seguintes etapas iniciais (a) extração do DNA da amostra a ser examinada e (b) amplificação através da PCR (em condições apropriadas) do DNA da região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania* utilizando iniciadores específicos (a exemplo das sequências SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2) e é caracterizado por compreender mais duas etapas adicionais de:

(c) Digestão dos produtos de amplificação da etapa (b) com uma enzima de restrição específica cuja ação sobre esse produto é seletiva em relação à espécie de *Leishmania* presente na amostra e;

(d) Separação dos produtos de digestão da etapa (c) por eletroforese e análise da migração das bandas geradas, isto é, o tamanho dos fragmentos de DNA obtidos.

2. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato da enzima de restrição usada na etapa (c) ser selecionada do grupo consistindo de Bsl I, Hae III, Hae I, ApaI I, Mnl I, BsiHKA I, Bsp I 12861, Taq II, Bsg I, Apo I, EcoR I, Apo I, Ava I, Aci I.

3. Método de acordo com a reivindicação 2 caracterizado pelo fato da enzima de restrição ser Hae III.

4. Método de acordo com a reivindicação 3 caracterizado pelo fato de serem produzidos dois fragmentos, um de 80 pb e o outro de 40 pb, para a *Leishmania* (*Viannia*) enquanto que para a *Leishmania* (*Leishmania*) o fragmento de 120 pb mantém o seu tamanho.

5. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato da análise da migração das bandas geradas na etapa (d) ser feita por RFLP.

6. Kit para uso na diferenciação entre *Leishmania* (Viannia) e *Leishmania* (*Leishmania*) por PCR caracterizado por conter iniciadores específicos construídos a partir da região conservada do DNA do minicírculo do cinetoplasto de *Leishmania*; DNA de cepas referência das espécies *Leishmania* (Viannia) e *Leishmania* (*Leishmania*) para servirem de padrão; uma ou mais enzimas de restrição específica(s) cuja ação sobre os produtos de amplificação seja seletiva em relação à espécie de *Leishmania* presente na amostra e; todos os reagentes necessários para realizar a PCR.

7. Kit de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo fato dos iniciadores específicos compreenderem as seqüências SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2.

8. Kit de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo fato da enzima de restrição ser selecionada do grupo consistindo de Bsl I, Hae III, Hae I, ApaI I, Mnl I, BsiHKA I, Bsp I 12861, Taq II, Bsg I, Apo I, EcoR I, Apo I, Ava I, Aci I.

9. Kit de acordo com a reivindicação 8 caracterizado pelo fato da enzima de restrição ser Hae III.

10. Kit de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo fato da análise da migração das bandas geradas após separação dos produtos de digestão por eletroforese ser feita por RFLP.

11. Kit de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo fato de, adicionalmente ser fornecido e um protocolo e

um manual para instruir o usuário.

12. Método de diferenciação de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por diferenciar *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonenses*.

13. Kit de acordo com a reivindicação 6 caracterizado por diferenciar *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonenses*.

14. Método de diferenciação de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por diferenciar *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonenses*.

15. Kit de diferenciação de acordo com a reivindicação 6 caracterizado por diferenciar *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonenses*.

Leishmania (Viannia) braziliensis (U19803)

```

MnII      BslI      BscGI
|          |          |
590  gggttaggggngtttctgcgaaaaaccgaaaaatggcatacagaaaccccggttcaaaaaatgcccgaaaatcgctat 664

      Tsp509I
      BsiHKAI|
      Bsp1286I|
      MnII||
CviJI    CviRI|||
HaeI     ApaLI |||
HaeIII   BscGI| |||
          |  | |||
665  ttttggcctcccggtgcacaattaggggttggtgtaatatagtggg 710
          |  |

```

L. (Leishmania) amazonensis (M21325)

```

                                ApoI
                                EcoRI
                                Tsp509I
                                ApoI
                                Tsp509I
                                BsgI
                                BscGI
                                CviRI
                                TaqII
47  ggggagggcggttctcaaaaatggcaaaaatgggtgcagaaaccccgtcatattttcgggggaattcgggggaatt 120
                                BfiI
                                BsrI
                                HphI
                                BbvI
                                AciI
                                CviJI
                                AciI
121  tcggctcgggcggtgaaaactgggggttggtgtaaaaatagggg 163

```

FIGURA 1



FIGURA 2

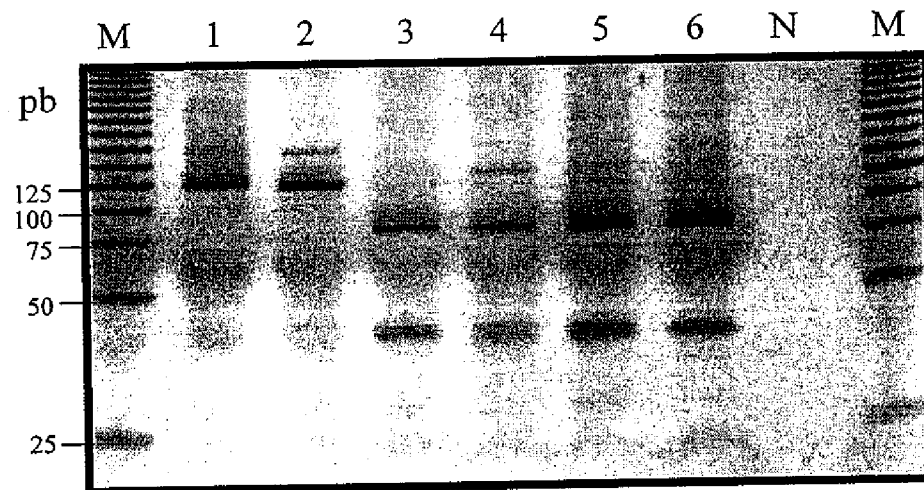


FIGURA 3

RESUMO

"MÉTODO E KIT PARA A DIFERENCIAÇÃO DE *Leishmania* (*Viannia*) de *Leishmania* (*Leishmania*), CAUSADORAS DE LEISHMANIOSE, POR PCR-RFLP"

5 O objetivo da presente invenção é a diferenciação molecular das espécies de parasitos *Leishmania* (*Viannia*) de *L. (Leishmania)*, mais particularmente, entre os subgêneros das espécies *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e/ou *L. (V.) guyanensis* de *L. (Leishmania)*
10 *amazonensis*, através de PCR-RFLP.

Uma primeira concretização da presente invenção diz respeito a um método de diferenciação entre essas duas espécies de *Leishmania*, através da amplificação por PCR da região conservada do minicírculo do kDNA de
15 *Leishmania*, seguida de clivagem dos produtos da PCR com uma enzima de restrição específica e análise dos fragmentos gerados por técnica apropriada como, por exemplo, por RFLP.

Numa segunda concretização, a invenção é dirigida
20 a kit diagnóstico a ser utilizado no método de diferenciação entre as espécies de parasitos *Leishmania* (*Viannia*) de *L. (Leishmania)*, mais particularmente, *L. (V.) braziliensis* e/ou *L. (V.) guyanensis* de *L. (L.) amazonensis* da presente invenção compreendendo todos os
25 reagentes necessários para a realização da técnica de PCR, a saber: iniciadores específicos, nucleotídeos e solução tampão apropriada para a amplificação por PCR, *Taq* polimerase, enzima de restrição e tampão adequado,

DNA de cepas referência das espécies *Leishmania* (Viannia) e *L. (Leishmania)*, mais particularmente, *L. (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, para servirem de padrão e um protocolo e

5 manual para instruir o usuário.