

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Desenvolvimento e validação de um ensaio de PCR-ELISA para o
diagnóstico da leishmaniose visceral humana em amostras de
sangue periférico**

por

Fernanda Alvarenga Cardoso

**Belo Horizonte
Fevereiro/2013**

DISSERTAÇÃO MDIP- CPqRR

F.A. CARDOSO 2013

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Desenvolvimento e validação de um ensaio de PCR-ELISA para o
diagnóstico da leishmaniose visceral humana em amostras de
sangue periférico**

por

Fernanda Alvarenga Cardoso

**Dissertação apresentada com vistas à obtenção do
Título de Mestre em Ciências na área de
concentração de Doenças Infecciosas e
Parasitárias**

Orientação: Dra. Ana Rabello

Co-orientação: Dra. Luciana Inácia Gomes

**Belo Horizonte
Fevereiro/2013**

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

C268d
2013

Cardoso, Fernanda Alvarenga.

Desenvolvimento e validação de um ensaio de PCR-ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana em amostras de sangue periférico / Fernanda Alvarenga Cardoso. – Belo Horizonte, 2013.

xv, 94 f.: il; 210 x 297mm.

Bibliografia: 91 - 109

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose Visceral/diagnóstico 2. *Leishmania donovani* /parasitologia 3.Reação em Cadeia da Polimerase/métodos 4. Coleta de Amostras Sanguíneas/métodos I. Título. II. Rabello, Ana Lúcia Teles (Orientação). III. Gomes, Luciana Inácia (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 4

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

Desenvolvimento e validação de um ensaio de PCR-ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana em amostras de sangue periférico

por

Fernanda Alvarenga Cardoso

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Ana Lúcia Teles Rabello (Presidente)

Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero

Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

Suplente: Prof. Dr. Daniel Moreira de Avelar

Dissertação defendida e aprovada em: 22/03/2013.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha mãe, Elvania, meu exemplo de vida e luta, pela força, incentivo e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela sua infinita bondade e amor.

À Dra. Ana Rabello, pela acolhida em seu laboratório, orientação, paciência, compreensão e oportunidade.

À Dra. Luciana Inácia Gomes, pela orientação, pelo apoio constante e ensinamentos no decorrer do trabalho.

Ao Dr. Edward José de Oliveira, pelo apoio, ensinamentos e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisas Clínicas, de forma especial a Carolina, Thaís Almeida, Tália, Eliane, Daniela, Bruna, Gisele, Lucas, Thaís Diniz, Juliana e Gláucia.

Aos amigos do Serviço de Doenças Parasitárias (Funed), Andreza, Ronaldo, Regina, Luana, Adriana, Andréia, Marília, Eliana e Goretti, pelo apoio, incentivo, paciência e carinho.

Ao meu irmão Alessandro, meu grande amigo, pelo incentivo e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao meu noivo, Diogo, meu refúgio e descanso, pelo companheirismo, incentivo e amor.

A Ziza e tia Inha pelo carinho e acolhidas nos momentos mais difíceis.

Às amigas e companheiras Fernanda, Ana Maria e Mariana pelo carinho e apoio, dividindo comigo grande parte desta caminhada.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, pela oportunidade.

A Fundação Ezequiel Dias (Funed) pelo apoio, incentivo e liberação para realização do mestrado.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa concedida através do Programa de Capacitação de Recursos Humanos do Estado de Minas Gerais (PCRH).

A todos que, de alguma forma e em algum momento, contribuíram para concretização desta conquista.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVO	19
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 As Leishmanioses.....	22
3.1.1 Leishmaniose Visceral.....	23
3.2 Diagnóstico clínico e laboratorial.....	26
3.2.1 Diagnóstico clínico.....	26
3.2.2 Diagnóstico laboratorial.....	27
3.2.2.1 Exames parasitológicos.....	27
3.2.2.2 Métodos sorológicos.....	28
3.2.2.3 Métodos moleculares.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Parte I – Desenvolvimento do ensaio de PCR-ELISA.....	41
4.1.1 Material biológico.....	41
4.1.2 Extração de DNA.....	42
4.1.3 Desenvolvimento do ensaio de PCR-ELISA kDNA.....	42
4.1.4 Padronização do ensaio de PCR-ELISA kDNA.....	44
4.1.5 Desenvolvimento do ensaio de PCR-ELISA ACTB humano.....	46
4.1.6 Padronização do ensaio de PCR-ELISA ACTB.....	47
4.1.7 Análise dos dados.....	48
4.2 Parte II- Determinação do desempenho do ensaio de PCR-ELISA kDNA no diagnóstico de diferentes grupos clínicos de LV.....	50
4.2.1 Cálculo de amostra.....	50
4.2.2 Material biológico.....	50
4.2.3 Reação de PCR kDNA e ACTB.....	52
4.2.4 Reação de PCR-ELISA kDNA e ACTB.....	53

4.2.5 Análise dos dados	53
5 RESULTADOS	54
5.1 Parte I – Padronização do ensaio de PCR-ELISA (kDNA e ACTB humano)	55
5.1.1 Desenvolvimento do ensaio de ELISA kDNA	55
5.1.2 Desenvolvimento do ensaio de ELISA ACTB humano	69
5.2 Parte II- Determinação do desempenho do ensaio de PCR-ELISA kDNA no diagnóstico de diferentes grupos clínicos de LV	73
5.2.1 Avaliação do potencial diagnóstico e do desempenho do ensaio PCR-ELISA kDNA ...	73
5.2.2 Ensaio de PCR-ELISA ACTB humano.....	74
5.2.3 Classificação dos indivíduos (negativos, positivos e indeterminados) de acordo com a leitura de absorbância no ensaio de PCR-ELISA kDNA	75
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÕES	88
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Comparação das leituras de absorvância obtidas no ensaio de PCR-ELISA kDNA com o uso de diferentes concentrações de estreptavidina na microplaca MaxiSorp® (ThermoScientific Nunc).....56**
- Figura 2. Comparação das leituras de absorvância no ensaio de PCR-ELISA kDNA com diferentes diluições do DNA amplificado das amostras e controles na microplaca MaxiSorp® (ThermoScientific Nunc).....57**
- Figura 3. Comparação das leituras de absorvância no ensaio de PCR-ELISA kDNA com o uso de diferentes soluções de hibridização.58**
- Figura 4. Comparação das leituras de absorvância no ensaio de PCR-ELISA kDNA com diferentes concentrações de sonda na solução de hibridização59**
- Figura 5. Comparação das leituras de absorvância no ensaio de PCR-ELISA kDNA com diferentes marcas de anticorpo anti-fluoresceína conjugado a peroxidase..... 60**
- Figura 6: Curva ROC – Análise dos 14 casos de LV e 11 indivíduos não infectados para determinação do *cut-off* da reação 62**
- Figura 7. Gel de poliacrilamida 6%, corado pelo nitrato de prata mostrando os produtos amplificados do DNA cultura de *L. (L.) infantum*. 63**
- Figura 8. . Gel de poliacrilamida 6%, corado pelo nitrato de prata, apresentando produtos amplificados (120 pb) do kDNA em amostras controle negativas, contaminadas com diferentes concentrações de DNA extraído de cultivo de *L. (L.) infantum*..... 64**
- Figura 9. Gel de poliacrilamida 6%, corado pelo nitrato de prata, apresentando produtos amplificados do DNA de amostras de sangue periférico obtidas de indivíduos não infectados direcionadas ao gene do kDNA..... 65**
- Figura 10. Comparação das leituras de absorvância com diferentes títulos do anticorpo IgG de coelho anti-fluoresceína Oregon Green® conjugado a peroxidase (Invitrogen, Califórnia, EUA) avaliados no ensaio de PCR-ELISA ACTB humano. 71**
- Figura 11. Curva ROC das amostras de indivíduos portadores da LV ativa e assintomáticos 76**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Leituras de absorvância de acordo com duas concentrações de estreptavidina, usadas na sensibilização da microplaca de ELISA.....	55
Tabela 2. Leituras da absorvância de acordo com a solução de hibridização usada no ensaio de PCR-ELISA kDNA	58
Tabela 3. Leituras de absorvância de acordo com a concentração da sonda usada no ensaio de PCR-ELISA kDNA	59
Tabela 4. Leitura de absorvância de acordo com as marcas dos anticorpos anti-fluoresceína conjugado a peroxidase usados no ensaio de PCR-ELISA kDNA	60
Tabela 5. Leituras das absorvâncias de acordo com a titulação do anticorpo anti-fluoresceína conjugado a peroxidase	61
Tabela 6. Determinação do <i>cut-off</i> através da análise dos resultados da Curva ROC	62
Tabela 7. Médias das leituras de absorvância do ensaio de PCR-ELISA kDNA na avaliação do DNA extraído de cultura de <i>L.(L.) infantum</i> em diluições seriadas.....	63
Tabela 8. Médias das leituras de absorvância das amostras de sangue periférico adicionadas de parasitos em diferentes concentrações e avaliadas no ensaio de PCR-ELISA kDNA.	64
Tabela 9. Especificidade analítica dos métodos de PCR com avaliação por eletroforese em gel de poliacrilamida e PCR-ELISA kDNA	66
Tabela 10. Concentração de DNA e resultado de PCR-ELISA ACTB das amostras de portadores de LV e indivíduos não infectados utilizados para a avaliação das medidas de precisão intra-ensaio (repetibilidade) e inter-ensaios (reprodutibilidade) no ensaio de PCR-ELISA kDNA.....	67
Tabela 11. Leituras das absorvâncias das amostras de DNA de <i>L.(L.) infantum</i> , indivíduos portadores da LV e não infectados avaliadas na análise da repetibilidade do ensaio PCR-ELISA kDNA	67
Tabela 12. Leituras das absorvâncias das amostras de DNA de <i>L.(L.) infantum</i> , indivíduos portadores da LV e não infectados avaliadas na análise da reprodutibilidade do ensaio PCR-ELISA kDNA	68
Tabela 13. Análise da concordância entre o ensaio de PCR-ELISA kDNA e o PCR com revelação por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% na avaliação do DNA extraído de amostras de sangue periférico de 25 amostras de indivíduos casos de LV e não infectados	68
Tabela 14. Leituras das absorvâncias apresentadas pelas amostras de DNA total extraídas de sangue periférico de indivíduos sadios na padronização do ensaio de PCR-ELISA ACTB humano	69
Tabela 15. Leituras das absorvâncias do ensaio de PCR-ELISA ACTB humano de	

acordo com o uso das diferentes diluições do DNA das amostras na microplaca MaxiSorp® (ThermoScientific Nunc).....	70
Tabela 16. Leituras das absorvâncias das diferentes concentrações do anticorpo IgG anti-fluoresceína Oregon Green® conjugado a peroxidase (Invitrogen, Califórnia, EUA) avaliadas no ensaio PCR-ELISA ACTB humano.....	70
Tabela 17. Avaliação das amostras de sangue periférico obtidas de indivíduos não infectados e adicionadas com diferentes concentrações da amostra referência de <i>L. (L.) infantum</i> (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) (10.000, 1.000, 100, 10 e 1 parasito/ml) pelo ensaio de PCR-ELISA ACTB humano.....	72
Tabela 18. Médias das leituras das absorvâncias das amostras de DNA total extraídas de sangue periférico de casos de LV e de indivíduos não infectados avaliadas pelo ensaio de PCR-ELISA ACTB humano	72
Tabela 19. Avaliação do potencial diagnóstico do ensaio de PCR-ELISA kDNA no diagnóstico da infecção por <i>L.(L.) infantum</i> nos grupos de indivíduos portadores da LV clássica e da co-infecção <i>Leishmania/HIV</i>	73
Tabela 20. Avaliação do potencial diagnóstico do ensaio de PCR-ELISA kDNA no diagnóstico da infecção por <i>L.(L.) infantum</i> nos grupos de indivíduos moradores de área endêmica.....	73
Tabela 21. Avaliação do ensaio de PCR-ELISA kDNA no diagnóstico da leishmaniose visceral em 130 pacientes doentes (indivíduos portadores de LV clássica e portadores da co-infecção <i>Leishmania/HIV</i>) e 40 indivíduos não infectados moradores de área endêmica.....	74
Tabela 22. Médias das leituras de absorvância das amostras de DNA de sangue periférico de indivíduos portadores de LV clássica, portadores da co-infecção <i>Leishmania/HIV</i> e moradores de área endêmica (assintomáticos e não infectados) avaliadas no ensaio de PCR-ELISA ACTB humano.....	75
Tabela 23. Número de indivíduos com a classificação clínica de acordo com o ensaio de PCR-ELISA kDNA e os grupos de pacientes do estudo	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcento
A	Absorbância
ACTB	Gene codificador para β -actina humana
BSA	Albumina de soro bovino
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
CV	Coefficiente de variação
DAT	Teste de Aglutinação Direta
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Trifosfato desoxinucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
fg	Fentogramas
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
g	Gramas
gp63	Glicoproteína 63
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kilodalton
IC	Intervalo de confiança
IgG	Imunoglobulina G
ITS	Espaçador não codificante interno
Kb	Kilobase
kDNA	Ácido Desoxirribonucleico do Cinetoplasto
L	Litro
LIT	Liver Infusion Tryptose
LPC	Laboratório de Pesquisas Clínicas
LSSP	Low-Stringency Single Specific Primer
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Microlitro

mM	MicroMol
MO	Medula óssea
N	Normal
n°	Número
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NNN	Neal Novy Nicolle
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS-T	Tampão Salina Fosfato –Tween
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
pMol	PicoMol
qPCR	PCR em tempo real
rDNA	Ácido desoxirribonucléico ribossomal
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorfism
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rK39	Antígeno recombinante rK39
RNA	Ácido Ribonucléico
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSC	Solução tampão de citrato de sódio
SSPE	Solução tampão de sódio fosfato EDTA.
SSU	Subunidade ribossomal
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
Tris-HCl	Tris Hidrocloro
µg	Micrograma
µL	Microlitro

RESUMO

Nas últimas décadas, a reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo utilizada para o diagnóstico da leishmaniose visceral (LV) com diferentes objetivos: o diagnóstico da infecção, da doença e o controle de cura. Para utilização em larga escala, a etapa de eletroforese para detecção dos produtos amplificados na PCR, torna a técnica complexa e onerosa. A PCR-ELISA representa uma alternativa de detecção do produto amplificado por PCR através de um ensaio imunoenzimático (ELISA). Esta técnica é capaz de conferir maior sensibilidade e rapidez para a análise de grandes números de amostras clínicas com o uso de equipamentos utilizados para processamento de ELISA e, portanto, permite realizar PCR para fins de diagnóstico em laboratórios de média complexidade. Assim, este estudo objetivou desenvolver e validar o método de detecção colorimétrica dos produtos de amplificação gerados pela reação de PCR para o diagnóstico da LV em amostras de sangue periférico. O método de PCR-ELISA foi desenvolvido para detecção de fragmento de DNA do cinetoplasto (kDNA), complexo *Donovani*-específico. Utilizando-se cepas referências de *Leishmania* em cultivo e de painel de amostras de sangue periférico humano de 11 indivíduos não infectados, moradores de área endêmica e 14 casos de LV, caracterizadas clínica e parasitologicamente, determinou-se o limite de detecção da reação, medidas de precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e limite entre positivo e negativo (*cut-off*). A avaliação do desempenho do ensaio foi realizada com amostras de sangue periférico de 105 pacientes portadores de LV, 25 pacientes portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV e de 73 indivíduos moradores de área endêmica para a LV. Foi desenvolvido ainda um ensaio de PCR-ELISA para detecção do DNA amplificado do gene humano ACTB, para uso como controle do processo de extração de DNA e amplificação por PCR das amostras clínicas. O ensaio PCR-ELISA kDNA desenvolvido apresentou limite de detecção de 1 parasito/mL de sangue e 0,07fg/ μ L de DNA de *L. (L.) infantum*, sensibilidade de 100% (IC 95%: 97,1 a 100%) e especificidade de 95% (IC 95%: 83,5 a 98,6%). Todos os indivíduos assintomáticos de área endêmica, com positividade por outras técnicas diagnósticas, foram também positivos pela PCR-ELISA. Todas as amostras foram testadas satisfatoriamente para o ensaio de PCR-ELISA ACTB. O ensaio de PCR-ELISA kDNA, desenvolvido e validado neste estudo, apresenta simplicidade metodológica e operacional, permite interpretação objetiva da amplificação por PCR do DNA de *Leishmania* do complexo *Donovani* e desempenho adequado no diagnóstico da LV em laboratórios de referência.

ABSTRACT

In recent decades, the polymerase chain reaction (PCR) has been used for the diagnosis of visceral leishmaniasis (VL) with different goals: diagnosis of infection, disease control and cure. For large-scale use, the step of electrophoresis to detect amplified products of PCR makes this technique more complex and costly. The PCR-ELISA is an alternative for the detection of the amplified PCR product through an immunoenzymatic assay (ELISA). This technique offers higher sensitivity and speed for the analysis of large numbers of clinical specimens, using equipment widely used for processing sets of ELISA and therefore allows performing PCR for diagnostic purposes in laboratory of medium complexity. Thus, this study aimed to develop and validate the colorimetric detection method (ELISA) for amplification products generated by PCR targeting the diagnosis of VL. The method of PCR-ELISA was developed to detect a fragment of DNA of kinetoplast (kDNA) specific from *Leishmania donovani* complex. Using reference strains of *Leishmania* in cultivation and a panel of human peripheral blood samples of 11 non-infected individuals, residents of endemic area and 14 cases of VL with clinical and parasitological characterization, we determined the detection limit of the reaction, precision measurements (repeatability and reproducibility) and limit between positive and negative (cut-off). The performance of the assay was evaluated with peripheral blood samples of 105 patients with VL, 25 patients showing the co-infection *Leishmania*/HIV and 73 individuals living in endemic areas for VL. A PCR-ELISA assay for detection of DNA from the human ACTB gene was also developed for use as control for the process of DNA extraction and amplification by PCR of clinical samples. The PCR-ELISA kDNA assay developed showed a detection limit of 1 parasite/ml blood and 0.07 fg/ μ L of DNA from *L. (L.) infantum*. The assay showed a sensitivity of 100% (IC 95%: 97.1 to 100%) and specificity of 95% (IC 95%: 83.5 to 98.6%). All asymptomatic individuals from an endemic area, who were diagnosed for LV by other techniques, were also positive by PCR-ELISA kDNA. All samples were tested satisfactorily by PCR-ELISA ACTB assay. The PCR-ELISA kDNA assay was developed and validated in this study. It presents methodological and operational simplicity; enables objective interpretation of PCR amplification of DNA from *Leishmania donovani* complex and have sufficient performance for diagnosis of VL in reference laboratories.

Leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa, causada por um protozoário intracelular do gênero *Leishmania*, cuja principal forma de transmissão é através da picada do vetor flebotomíneo (Santos et al., 1998). Os cães e as raposas são os principais reservatórios domésticos e silvestres, respectivamente, sendo o cão responsável pela persistência da doença no ambiente urbano. É uma doença crônica, sistêmica, caracterizada por febre de longa duração, hepatoesplenomegalia e pancitopenia e que na ausência de tratamento específico resulta em casos fatais (Pearson & Sousa, 1995).

A LV é uma enfermidade de grande importância para saúde pública, pois é endêmica em 88 países, com uma incidência anual estimada de 0,2 a 0,4 milhões de casos (Organização Mundial da Saúde - OMS, 2012). O Brasil detém 90% dos casos de LV registrados nas Américas. Somente em 2011 foram registrados 3984 casos e 262 óbitos pela doença no país (Ministério da Saúde-Brasil, 2013).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle das Leishmanioses, coordenado pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, estabelece que a estratégia de controle da LV deve ser fundamentada no tratamento de doentes, controle dos reservatórios domésticos e dos vetores e diagnóstico precoce da infecção/doença. O diagnóstico laboratorial da LV pode ser realizado por métodos sorológicos, parasitológicos e moleculares (Ministério da Saúde-Brasil, 2006).

Mesmo com o grande avanço tecnológico, o diagnóstico laboratorial da LV apresenta-se como um desafio em nosso tempo. Os exames parasitológicos, considerados métodos de referência, são métodos invasivos, requerem profissionais capacitados e em geral apresentam baixa sensibilidade. Os exames sorológicos podem apresentar reações cruzadas em vigência de outras doenças e não permitem a distinção entre infecção ativa, sub-clínica ou passada.

Os métodos moleculares são procedimentos úteis na detecção de baixas cargas parasitárias e que apresentam elevada sensibilidade. Os ensaios baseados em PCR constituem atualmente a principal abordagem no diagnóstico molecular. Mas para utilização em larga escala, a PCR necessita de ajustes para se tornar mais simples e com custo operacional mais baixo. Uma alternativa é a detecção colorimétrica (ensaio imunoenzimático- ELISA) dos produtos amplificados na PCR. Essa técnica permite uma interpretação objetiva dos resultados, a análise de grandes quantidades de amostras clínicas simultaneamente e o uso de equipamentos

amplamente utilizados para processamento de séries de ELISA. No entanto, ainda não foi desenvolvido um ensaio de PCR-ELISA que apresenta elevada sensibilidade e especificidade, seja validado em diferentes grupos clínicos com indivíduos de diferentes faixas etárias e que assegure o amplo uso do método para o diagnóstico da LV humana nos laboratórios de saúde pública. Sendo assim, este estudo teve como objetivo desenvolver e validar um ensaio de PCR-ELISA para o diagnóstico da LV humana.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar o método de detecção colorimétrica (ensaio imunoenzimático - ELISA) dos produtos de amplificação gerados pela reação de PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção do DNA amplificado de *L. (L.) infantum* na reação de PCR, estabelecendo condições padronizadas da reação, capacidade de detecção, medidas de precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e valor limite entre positivo e negativo.
- Avaliar o desempenho do ensaio de PCR-ELISA no diagnóstico da infecção por *L.(L.) infantum* em diferentes grupos de indivíduos: portadores da LV, portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV e moradores de área endêmica.
- Desenvolver um ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção do DNA amplificado do gene humano ACTB para uso como controle do processo de extração de DNA, bem como do processo de amplificação por PCR.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 As leishmanioses

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por várias espécies de protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e apresentam-se clinicamente sob duas formas: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). No subgênero *Leishmania* estão as espécies causadoras da LV: *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum* (sinônimo de *Leishmania (Leishmania) chagasi*). Neste mesmo subgênero, encontra-se a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, que juntamente com a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a *Leishmania (Viannia) guyanensis*, pertencentes ao subgênero *Viannia* e são espécies responsáveis pela LT (Lainson & Shaw, 1972; Maurício et al., 2000; Dantas-Torres, 2006).

O gênero *Leishmania* agrupa espécies de protozoários intracelulares obrigatórios, heteroxenos, encontrados nas formas promastigotas e amastigotas. As formas promastigotas possuem flagelo externo, são alongadas e losangular, encontram-se livres ou aderidas ao trato digestivo dos hospedeiros invertebrados; as amastigotas, não possuem flagelo externo, são ovaladas, normalmente habitam o interior de células do sistema retículo endotelial dos hospedeiros vertebrados e reproduzem-se por divisão binária dentro dos fagolisossomos (Michalick & Genaro, 2005).

A principal forma de transmissão do parasito para o hospedeiro vertebrado é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos (Santos et al., 1998). Quando a fêmea de flebotomíneo pica o hospedeiro com leishmaniose, ingere formas amastigotas junto com o repasto sanguíneo. No tubo digestivo do inseto as amastigotas se transformam em promastigotas, as quais sofrem uma série de mudanças morfológicas e fisiológicas, diferenciando-se em promastigotas metacíclicas ou infectantes. Estas formas se movem para a parte anterior do tubo digestivo e quando o inseto se alimenta novamente, ocorre à infecção por via hematogênica de um novo hospedeiro. Neste hospedeiro, os parasitos são fagocitados pelos macrófagos, se transformam em amastigotas e multiplicam-se por divisão binária, rompem a membrana celular e caem na corrente sanguínea. O ciclo se completa quando as amastigotas são ingeridas por novos flebotomíneos. Desta forma, a persistência da doença em uma determinada área depende basicamente de dois fatores: a presença de um vetor susceptível e a presença de um hospedeiro vertebrado infectado (Michalick & Genaro, 2005).

As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um importante problema de saúde pública mundial. Atualmente, este grupo de doenças afeta 98 países, estimando mais de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de contrair a doença, incidência de 2 milhões de novos casos por ano (0,2 a 0,4 milhões de casos de LV e 0,7 a 1,2 milhões de casos de LT) e 20.000 a 40.000 óbitos por ano. (OMS 2010 e 2012).

3.1.1 Leishmaniose visceral

A LV é uma doença causada por parasitos do complexo Donovan, sendo a espécie *L. (L.) donovani* na África e na Ásia, e *L. (L.) infantum* no Mediterrâneo, China, norte da África, no Brasil e no restante da América Latina. Na Índia, a LV também é conhecida como Kala-Azar, palavra de origem indiana que significa "doença negra" e febre Dum-Dum. Na região do Mediterrâneo é chamada LV infantil e na América Latina, LV americana ou calazar neotropical (Lainson & Shaw, 1972; Michalick & Genaro, 2005).

A primeira observação dos parasitos que causavam o Kala-Azar ocorreu na Índia por Cunningham (1885) em indivíduos acometidos pela doença. Em 1903, o agente etiológico foi descrito quase simultaneamente por William Leishman e Charles Donovan. Migone (1913) diagnosticou em Assunção-Paraguai, o primeiro caso autóctone proveniente do estado de Mato Grosso, Brasil. Ainda em 1913, outro caso de um paciente residente no Brasil foi diagnosticado na Itália (Franchine & Mantovani, 1913). Pena, em 1934 identificou 41 casos de LV através da detecção de formas amastigotas em lâminas de viscerotomias realizadas "post-mortem" em pacientes suspeitos de febre amarela, nos estados do Norte e Nordeste do país (Ministério da Saúde-Brasil, 2006).

Os casos de LV notificados são superiores a 58.000 por ano, entretanto este número não corresponde à realidade, pois somente dois terços dos países endêmicos registram dados de incidência. Usualmente a falta de registros humanos nestes países reflete a falta de ações de vigilância e outras investigações epidemiológicas. Cerca de 90% dos casos de LV ocorrem em cinco países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (OMS, 2012).

Dados relacionados com a mortalidade causada pela LV são escassos e geralmente representam somente mortes hospitalares. No subcontinente indiano, onde ocorre a maior proporção de casos de LV, as taxas de letalidade no período de 2004 a 2008 foram de 1,5% em Bangladesh (93 mortes/6.224 casos de LV); 2,4% na Índia (853 mortes/34.918 casos de

LV) e 6,2% no Nepal (91 mortes/1.477 casos de LV). Inquéritos de base comunitária, que incluem busca ativa de óbitos por LV estimam taxas de letalidade acima de 10% em países endêmicos. Índices registrados em povoados da Índia sugerem que 20% dos pacientes com LV morreram antes da doença ser reconhecida. No sul do Sudão, um estudo em uma comunidade demonstrou 20% de taxa de letalidade, entretanto, estima-se que 91% de todas as mortes por LV no país não são reconhecidas (OMS, 2012).

O Brasil apresentou 42.067 registros de casos de LV, nos últimos doze anos, resultando em uma incidência média de 1,92 casos por 100.000 habitantes durante este período (Ministério da Saúde-Brasil, 2013). Entre os anos de 2007 e 2011 foram relatadas 1.103 mortes por LV no país. Em 2002, todos os estados já apresentavam origem autóctone de casos de LV. (Maia-Elkhoury et al., 2008, Ministério da Saúde-Brasil, 2013).

Atualmente, o Brasil enfrenta a expansão e urbanização da LV com casos humanos e grande número de cães positivos em várias cidades de grande e médio porte. O ciclo de transmissão que anteriormente ocorria no ambiente silvestre e rural hoje também se desenvolve em centros urbanos. Duas décadas após o registro da primeira epidemia urbana em Teresina/Piauí, o processo de urbanização se intensificou com a ocorrência de importantes epidemias em várias cidades da região Norte (Boa Vista e Santarém), Nordeste (São Luís, Natal e Aracaju), Centro Oeste (Cuiabá e Campo Grande) e Sudeste (Belo Horizonte e Montes Claros) (Moreno et al., 2002). Belo Horizonte, a capital do estado de Minas Gerais, ilustra claramente o processo de urbanização da LV nas cidades brasileiras. A cidade convive com a LV desde 1993 e possui uma média anual de 125 casos de 2003 a 2011, sendo que no ano de 2011, foram notificados 93 casos de LV com 13 óbitos. As proximidades entre as habitações e a alta densidade populacional contribuíram para a rápida expansão da LV no ambiente urbano (Prefeitura de Belo Horizonte - PBH, 2013).

A importância da LV reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição, mas também na possibilidade da doença assumir formas graves e letais, principalmente em crianças e indivíduos imunossuprimidos, quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes. A LV engloba grande variedade de sinais e sintomas, podendo permanecer assintomática, sub-clínica ou evoluir para doença clinicamente manifesta (Badaró et al., 1986a,b). O período de incubação da doença geralmente varia de três a oito meses. As formas amastigotas do parasito encontram-se principalmente em órgãos linfóides como a medula óssea, o baço, o fígado e os linfonodos (Ministério da Saúde-Brasil, 2006). A doença

é caracterizada por febre, caquexia, hepatoesplenomegalia e pancitopenia, podendo ser fatal se não tratada (Pearson & Sousa, 1995).

A distribuição da LV na infância mostra-se semelhante em ambos os sexos, mas a partir da adolescência observa-se predominância em homens (Deane & Deane, 1996; Pedrosa & Rocha, 2004; Oliveira et al., 2006). A desnutrição tem sido descrita como um importante fator de risco para a aquisição da doença, principalmente em crianças (Badaró et al., 1986a; Maciel et al., 2008).

Além da transmissão vetorial, existem ainda outras vias de transmissão que ocorrem mais raramente e são através de transfusão sanguínea (Luz et al., 1997; Urias et al., 2007), transmissão congênita (Figueiro-Filho et al., 2004) e transplantes de órgãos (Basset et al., 2005; Antinori et al., 2008). Atualmente um novo tipo de transmissão relacionado ao compartilhamento de agulhas entre usuários de drogas tem sido descrito. Este tipo de transmissão ocorre em associação ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) e tem aumentado a frequência de indivíduos co-infectados com o vírus e o parasito *Leishmania* spp. Indivíduos portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV intensificam a carga parasitária, o que pode ocasionar formas clínicas mais graves da LV, dificultando o manejo da doença e aumentando até cinco vezes a letalidade dos pacientes. (OMS, 2010). Desde 1987 têm sido descritos no Brasil casos da co-infecção *Leishmania*/HIV (Ministério da Saúde-Brasil, 2011a), sendo que em 2007 e 2008 foram confirmados 166 e 278 casos da co-infecção *Leishmania*/HIV, respectivamente (Sousa-Gomes et al., 2011).

A droga de primeira escolha para o tratamento da LV no Brasil é o antimonial pentavalente. Esta droga possui administração intramuscular ou intravenosa, esquema terapêutico prolongado (20 a 40 dias), alta toxicidade, além de não ser sempre efetiva. Uma opção é a administração intravenosa da anfotericina B que possui também elevada toxicidade. Atualmente já estão disponíveis formulações lipídicas da anfotericina B, estas são menos tóxicas, mas de elevado custo o que dificulta a sua ampla utilização em saúde pública. (Ministério da Saúde-Brasil, 2011b).

O programa brasileiro de controle da LV baseia sua estratégia em três grupos de medidas: tratamento de casos humanos, controle dos reservatórios domésticos e dos vetores e diagnóstico precoce da infecção/doença. Estas medidas, porém, apresentam diversos obstáculos para sua implantação (Ministério da Saúde-Brasil, 2011b). O controle vetorial, que

é baseado na aplicação de inseticidas em residências, possui problemas relacionados às ações sempre descontínuas devido à escassez orçamentária e de recursos humanos adequadamente treinados (Melo 2004). O controle de reservatórios domésticos, através da remoção e sacrifício dos cães soropositivos tem sido discutido por se mostrar trabalhoso e de eficácia duvidosa (Dietze et al., 1997; Costa et al., 2007).

Em relação ao diagnóstico da doença, destaca-se a falta de padronização de métodos mais sensíveis e específicos para diagnosticar a infecção e a não disponibilização desses métodos para a população em geral, ficando restritos aos serviços de referência e laboratórios de pesquisa. Além disso, devido a sua relação direta com a pobreza ainda existe falta de políticas públicas em muitos países onde a doença é endêmica (Ministério da Saúde-Brasil, 2011b).

3.2 Diagnóstico clínico e laboratorial

3.2.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da LV é complexo, pois a doença no homem pode apresentar sinais e sintomas que são comuns a outras patologias, como, por exemplo, doença de Chagas, malária, esquistossomose, febre tifóide e tuberculose. A expressão clínica da doença varia de quadros assintomáticos à forma clássica (Badaró et al., 1986a). A LV também pode ser apresentada como recidiva (até 12 meses após a cura) ou reativação tardia de infecção subclínica ou tratada previamente (Ministério da Saúde-Brasil, 2006).

A tríade básica da LV é composta por febre, hepatoesplenomegalia e pancitopenia (Badaró et al., 1986a; Zilstra et al., 1992; Ministério da Saúde-Brasil, 2006). Na maioria dos casos a febre é o primeiro sintoma da doença, está presente em todo o curso da infecção e se associa a hiporexia e ao emagrecimento. A hepatoesplenomegalia apresenta graus diferentes, normalmente é indolor e não percebida pelo paciente. Astenia, palidez, dispnéia ao esforço são sintomas associados à anemia observada. A plaquetopenia pode ser grave e ocasionar sangramentos espontâneos. A leucopenia geralmente ocorre em todas as séries, agravando o dano à imunidade do paciente, o que facilita infecções bacterianas secundárias. Outros sinais e sintomas comuns são a tosse, edema de membros inferiores, icterícia e dor abdominal. Menos comuns são diarreias e vômitos. Estes se intensos, denotam gravidade. Em alguns casos a LV se manifesta sob a forma branda, não evoluindo a leishmaniose típica. Estes casos oligossintomáticos normalmente curam espontaneamente e são facilmente confundidos com

outras doenças ou simplesmente não diagnosticados (Badaró et al., 1986; Duarte et al., 1989; Ministério da Saúde-Brasil, 2006).

3.2.2 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da LV consiste, fundamentalmente, de três grupos de exames: os exames parasitológicos, os métodos sorológicos e os métodos moleculares.

3.2.2.1 Exames parasitológicos

Os exames parasitológicos são considerados classicamente como os métodos “padrão-ouro” no diagnóstico da LV e são baseados na demonstração do parasito e/ou no seu isolamento em cultivo. A demonstração do parasito pode ser feita através de material de biópsia ou punção aspirativa de baço, medula óssea, fígado ou linfonodos. O material obtido pode ser empregado para confecção de esfregaços ou impressão em lâminas, histologia, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório.

No exame parasitológico direto, as formas amastigotas de *Leishmania* spp. podem ser visualizadas após coloração (Giemsa ou Leishman). A sensibilidade desta técnica varia de 95 a 98% para o aspirado de baço (Chulay & Bryceson, 1983; Zijlstra et al., 1992; OMS, 2010), 76 a 91% para o aspirado de fígado, 52 a 89% para o aspirado de medula óssea e 52 a 69% para o aspirado de linfonodos (Zijlstra et al., 1992; Ho et al., 1948; Zijlstra et al., 1992; Babiker et al., 2007). Elevada sensibilidade é descrita quando se utiliza o aspirado esplênico, porém esta amostra não é utilizada devido à dificuldade técnica e operacional para realizar com segurança o procedimento de coleta, relacionado principalmente ao risco de hemorragia fatal (Sundar & Raí, 2002). O material biológico de referência para a realização do exame direto e isolamento, no Brasil, é a punção aspirativa da medula óssea, entretanto esse procedimento também é invasivo, requer local apropriado para realização da coleta, além de infraestrutura laboratorial e experiência do laboratorista (Ministério da Saúde-Brasil, 2006).

Para o isolamento em cultivo são utilizados os meios de cultura NNN (Neal Novy Nicolle) e com maior taxa de positividade em menor tempo os meios Schneider e LIT (Liver Infusion Triptose). As culturas devem ser mantidas entre 24-26°C e observadas semanalmente durante até quatro semanas. A inoculação experimental em hamsters (*Mesocricetus* spp) de amostras de tecidos de pacientes com suspeita de LV não tem valor prático no diagnóstico da doença

devido ao seu tempo de positividade (1 a 3 meses), apesar do método possuir sensibilidade acima de 90% (Ministério da Saúde-Brasil, 2006; Singh, 2006).

3.2.2.2 Métodos sorológicos

Os exames sorológicos são diagnósticos baseados na pesquisa de anticorpos. Devido à expressiva estimulação policlonal de linfócitos B, que resulta em hipergamaglobulinemia e grande produção de anticorpos na LV, o diagnóstico através de testes sorológicos é favorecido. No entanto, podem apresentar reações cruzadas com outras doenças, como doença de Chagas, esquistossomose, malária, febre tifóide e tuberculose; podem permanecer positivos durante longo tempo após o tratamento e não permitir avaliação do efeito da terapia (Badaró et al., 1986a; Gontijo & Melo, 2004).

Diferentes técnicas sorológicas têm sido utilizadas no diagnóstico da LV. Os testes diferem em sua sensibilidade e especificidade, na sua aplicação prática nas condições de campo e na disponibilidade de reagentes. Atualmente são usados o teste de aglutinação direta (DAT), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), os testes imunocromatográficos e ensaio imunoenzimático (ELISA).

O DAT foi desenvolvido por El Harith et al. (1986) para ser utilizado no diagnóstico da LV. A metodologia consiste em uma reação em que os anticorpos, na presença dos antígenos (promastigotas mortas), após um período de incubação, gera uma reação de aglutinação visível a olho nu. O teste é semi-quantitativo, podendo ser utilizado em soro, sangue ou urina (El Harith et al., 1986; El Harith et al., 1988; Ferreira & Ávila, 2001; Islam et al. 2004). Um dos desafios para a utilização do DAT era a limitada estabilidade do teste devido a utilização de antígenos líquidos. Em 1995, Meredith et al., testaram um antígeno estável em temperatura ambiente por um período prolongado, e encontraram 92% de sensibilidade e 99,7% de especificidade. Oliveira et al. (2009) desenvolveram um novo antígeno com alterações na preparação antigênica. O teste foi avaliado em 61 casos de LV comprovados parasitologicamente e 96 controles portadores de outras doenças, observando sensibilidade de 93,4% e especificidade de 96,9%. Em 2011, Oliveira et al. compararam o desempenho do método com diferentes diluentes, a fim de utilizar reagentes menos tóxicos. Foram utilizados 89 casos de LV comprovados parasitologicamente e 130 controles, sendo 97 portadores de outras doenças e 33 indivíduos saudáveis de área endêmica. O DAT usando 2-mercaptoetanol,

Kaolin e N-acetilcisteína apresentou sensibilidades de 94,4; 95,5 e 100%, respectivamente, e especificidade de 99,2; 100 e 97,7%, respectivamente. Recentemente, os pesquisadores desta mesma equipe desenvolveram um protótipo de kit, o DAT-LPC, para o diagnóstico da LV (Edward Oliveira, comunicação pessoal, Fundação Oswaldo Cruz -FIOCRUZ).

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) tem sido amplamente usada no diagnóstico da LV desde 1964 (Duxbury & Sadun, 1964). A metodologia consiste em uma reação antígeno-anticorpo visualizada com o auxílio de um conjugado fluorescente e os resultados são expressos em diluições. Dependendo do tipo de antígeno utilizado no teste (espécie de *Leishmania* e preparação antigênica) a sensibilidade do teste pode variar de 82 a 95% e especificidade de 78 a 92% (Sengupta, 1969; Cahil, 1970; Maia et al., 2012).

O único kit de RIFI disponível para os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacens) no Brasil é produzido pela Bio-Manguinhos, unidade produtora de Imunobiológicos da (FIOCRUZ) e utilizam como antígeno promastigotas de *Leishmania (Viannia) major-like*. Em 2008, Pedras et al. obtiveram 92% de sensibilidade e 88% de especificidade, ao avaliarem o desempenho da RIFI, utilizando o kit da Bio-Manguinhos, em 88 casos de LV confirmados parasitologicamente e 105 controles (85 portadores confirmados de outras doenças e 20 indivíduos saudáveis de área endêmica). Em outro estudo, Assis et al. (2008), avaliaram o desempenho da RIFI utilizando kit fornecido por Bio-Manguinhos, em 213 casos de LV confirmados parasitologicamente e 119 controles (pacientes com a clínica sugestiva de LV, diagnóstico parasitológico negativo, e portadores confirmados de outras doenças). Os resultados do estudo indicaram 88% de sensibilidade e 81% de especificidade. O desempenho da RIFI (Bio-Manguinhos), também foi avaliado, por Magalhães Peruhype et al. (2012), em 195 casos de LV confirmados parasitologicamente e 85 controles (pacientes com clínica suspeita para LV, diagnóstico parasitológico negativo e portadores confirmados de outras doenças), observando sensibilidade de 88,6% e especificidade de 80,0%. Além da menor sensibilidade e especificidade se comparado como outras técnicas sorológicas, este método ainda apresenta como desvantagem a necessidade de um microscópio de imunofluorescência e a subjetividade da leitura.

Nos últimos anos, os testes imunocromatográficos têm sido utilizados como método de diagnóstico da LV em vários países. O princípio do método consiste em uma ligação entre os anticorpos com os antígenos recombinantes, fixados na fita teste, possibilitando após alguns

minutos a visualização de uma reação de cor. O antígeno mais utilizado nos testes é o rK39, o qual é específico para o complexo *Donovani* (Burns et al,1993). Dependendo do formato do teste a sensibilidade pode variar de 67 a 100% e a especificidade de 59 a 100% (Sundar et al., 1998; Zijlstra, 2001; Carvalho et al., 2003; Ritmeijer et al., 2006; Assis et al., 2008). Os testes imunocromatográficos apresentam fácil execução e interpretação dos resultados, não necessitam de infra-estrutura laboratorial e profissionais especializados para a execução (Bern et al., 2000; Delgado et al., 2001; Zijlstra et al., 2001; Brandonísio et al., 2002; Lqbal et al., 2002; Sundar & Raí, 2002). De acordo com a OMS, em serviços primários de saúde localizados em regiões rurais endêmicas, o teste rápido deve ser utilizado e pacientes apresentando clínica suspeita, com um teste rápido positivo e nenhuma história prévia de LV tratados (OMS, 2012).

Atualmente, alguns kits estão disponíveis comercialmente para o diagnóstico da LV: IT-LEISH[®] (Bio-Rad Laboratories), KALA-AZAR DETECT[®] (InBios International), CRYSTAL[®] (Span Diagnostic) e ONSITE LEISHMANIA AB RAPID[®] (CTK Biotech). O KALA-AZAR DETECT[®] é padronizado para uso em soro e o ITLEISH[®] para uso em soro e sangue.

Carvalho et al (2003) avaliaram o teste rápido KALA-AZAR DETECT[®], em 128 casos de LV confirmados parasitologicamente e 60 controles (10 indivíduos saudáveis de área endêmica e 50 portadores confirmados de outras doenças), observando 90% de sensibilidade e 100% de especificidade. Em 2008, Assis et al., avaliaram o teste rápido IT-LEISH[®] em 213 casos de LV confirmados parasitologicamente e 119 controles com confirmação de outras doenças. O teste IT-LEISH[®] apresentou sensibilidade de 93% e especificidade de 97%. Em 2010, o Ministério da Saúde, disponibilizou o teste KALA-AZAR[®] para avaliação do seu desempenho pelos laboratórios de referência no Brasil (José Ronaldo Barbosa, Fundação Ezequiel Dias, comunicação pessoal). Barbosa (2010) avaliou o desempenho do teste rápido KALA-AZAR DETECT[®] em 40 casos de LV confirmados pela PCR e 60 controles (20 amostras sorologicamente positivas para doença de Chagas através de Hemaglutinação Indireta, Imunofluorescência Indireta e ELISA, 39 amostras com quadro clínico sugestivo de LV, uma amostra confirmada para leishmaniose tegumentar e 10 indivíduos saudáveis de área endêmica), observando 75% de sensibilidade e 100% de especificidade. Peruyhpe Magalhães et al. (2012), comparam o teste rápido KALA-AZAR DETECT[®] com o IT-LEISH[®] em 195 casos de LV confirmados parasitologicamente e 85 controles (pacientes com clínica suspeita para LV, com diagnóstico parasitológico negativo e confirmação de outras doenças),

observando sensibilidade de 88,1% e 93,3% e especificidade de 90,6% e 96,5%, respectivamente.

De acordo com o Ministério da Saúde (2011) os testes imunocromatográficos devem ser utilizados principalmente na assistência primária à saúde, possibilitando a redução entre o tempo de diagnóstico e o tratamento dos pacientes, trazendo um avanço para o controle da doença.

O teste de ELISA é amplamente utilizado para o imunodiagnóstico de LV. Baseia-se na ligação anticorpos-antígenos, identificada por um conjugado marcado com uma enzima, de maneira que esta enzima age sobre um substrato e a reação faz com que um reagente cromógeno mude de cor. É um teste que permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, de fácil execução e leitura objetiva dos resultados. Em geral, a técnica é extremamente sensível, porém, sua especificidade é dependente do antígeno utilizado. Variações de 80 a 100% de sensibilidade e 71 a 100% de especificidade são relatadas, quando os testes de ELISA utilizando antígeno bruto de *Leishmania* spp. (Sundar & Raí, 2002; Assis et al., 2008; Pedras et al., 2008). Variações de 93 a 99% e especificidade de 93 a 100% são relatadas quando se utiliza o antígeno recombinante rK39 (Braz et al., 2002; Maalej et al., 2003; Kurkjian et al., 2005; Assis et al., 2008; Pedras et al., 2008).

O desempenho do ensaio de ELISA com antígeno bruto de *L. (L.) infantum* foi avaliado por Carvalho et al. (2003), utilizando 128 casos de LV confirmados parasitologicamente e 60 controles (10 indivíduos saudáveis de área endêmica e 50 portadores confirmados de outras doenças), foi observado 98% de sensibilidade e 89% de especificidade. Pedras et al. (2008), também avaliaram o desempenho dos ensaios de ELISA utilizando antígenos brutos de *L. (L.) infantum*, em 88 casos de LV confirmados parasitologicamente e 105 controles (85 portadores confirmados de outras doenças e 20 indivíduos saudáveis de área endêmica), obtendo como resultado 88,6% de sensibilidade e 85% de especificidade. Neste mesmo estudo foi avaliado um ensaio de ELISA utilizando antígeno recombinante rK39 com resultados 95,5% de sensibilidade e 97% de especificidade. Em 2008, Assis et al. utilizando antígeno bruto de *L. (L.) infantum* e rK39, analisaram o desempenho do ELISA em 213 casos de LV confirmados parasitologicamente e 119 controles (pacientes com a clínica sugestiva de LV, diagnóstico parasitológico negativo, e portadores confirmados de outras doenças), obtendo resultados de 92 e 97% de sensibilidade e 77 e 84% de especificidade, respectivamente.

Além do ensaio de ELISA ser um teste pouco preciso na identificação de casos subclínicos e indivíduos assintomáticos, em imunossuprimidos a reação de ELISA, com antígeno bruto apresenta sensibilidade de 60 a 89% (Deniau et al., 2003).

3.2.2.3 Métodos moleculares

A partir da década de 80, várias técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas para a detecção e identificação precisa dos parasitas do gênero *Leishmania*. Nos estudos com LV, a PCR tem sido utilizada com várias finalidades além do diagnóstico, tais como o monitoramento do tratamento, controle de cura e estudos epidemiológicos (Adhya et al., 1995; Disch et al., 2004; Gontijo e Melo, 2004; Antinori et al., 2007; Viana et al., 2008; Alborzi et al., 2009). Com este método o DNA da *Leishmania* pode ser detectado em diferentes amostras biológicas tais como sangue periférico, soro, urina, aspirados de medula óssea, baço, fígado ou linfonodos (Disch et al., 2003; Assis et al., 2008; Fisa et al., 2008).

Apesar da técnica de PCR necessitar de infra-estrutura laboratorial e de profissionais especializados para a sua realização, não necessita dos procedimentos médicos especializados para obtenção de aspirado de medula óssea ou baço, que são dolorosos, invasivos, dependem de profissionais especializados, cuidado terciário de atenção e de custos mais elevados. Além disso, é uma técnica que complementa o diagnóstico parasitológico e sorológico e apresenta elevadas taxas de sensibilidade e especificidade. Variações de 91 a 100% de sensibilidade e 87 a 100% de especificidade são relatadas quando se utiliza sangue periférico (Wu et al., 1997; Disch et al., 2003; Maurya et al., 2005).

Apesar de ser um método sensível para a detecção de *Leishmania* em uma variedade de materiais clínicos de humanos e cães, a PCR é mais usada em atividades de pesquisa do que no diagnóstico de rotina. (Gontijo & Melo, 2004). Devido aos inúmeros alvos moleculares e diferentes ensaios utilizados nos diversos métodos de PCR para o diagnóstico das leishmanioses, há um consenso para a necessidade de sua padronização, a fim de ampliar suas possibilidades de utilização.

Os métodos baseados em PCR para detectar espécies de *Leishmania* em amostras clínicas têm sido aperfeiçoados para amplificar genes do miniexon, regiões do DNA codificadoras das subunidades ribossomais (Cupolillo et al., 2003), DNA do cinetoplasto - kDNA (Degraeve et al., 1994) e outras seqüências de DNA nuclear (Noyes et al., 1998). Estes métodos são de

especificidade variada; alguns detectam as espécies de *Leishmania* conhecidas, enquanto outros identificam o parasito em gênero e subgênero (Noyes et al., 1998).

Para o diagnóstico das leishmanioses, um dos principais alvos das técnicas moleculares desenvolvidas até o momento é o kDNA (Rodgers, et al., 1990; Pirmez et al., 1999; Romero et al., 2001). Esta estrutura é constituída de uma rede de DNA extra-nuclear que se organiza concatenadamente em milhares de moléculas circulares. Os dois tipos de moléculas de DNA presentes no cinetoplasto são os maxicírculos e os minicírculos. Enquanto os maxicírculos do kDNA possuem de 20 a 40kb de tamanho e apresentam em torno de 30 a 50 cópias, os minicírculos possuem usualmente um tamanho de 1kb e apresentam 10.000 a 20.000 cópias de seqüências (Rodgers et al., 1990). Os minicírculos do kDNA de *Leishmania* tem sido alvo de sondas na realização da hibridização com o objetivo de identificar, caracterizar e diagnosticar espécies de *Leishmania*, contribuindo decisivamente para sensibilidade e a especificidade da metodologia em questão (Rodgers et al., 1990 e Degraeve et al., 1994). Bons resultados com esses iniciadores foram obtidos utilizando diferentes técnicas de PCR como PCR em tempo real, RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorfism- Polimerase Chain Reaction), PCR convencional e LSSP-PCR (Low-Stringency Single Specific Primer Polimerase Chain Reaction) (Mary et al., 2004 ; Alonso et al., 2010; Srivastava et al., 2011; Alvarenga et al., 2012) com elevada sensibilidade em amostras de sangue periférico, e identificando o DNA de *Leishmania* em portadores assintomáticos (Mary et al., 2004).

O DNA ribossômico (rDNA) possui unidades repetidas dentro da região nucleolar, com cerca de 100 a 500 cópias. Cada unidade de transcrição é composta de uma região promotora líder, o espaçador transcrito externo (ETS – External Transcribed Spacer), uma região codificadora do rRNA 18S, um espaçador não codificante interno (ITS-1), uma região codificadora do rRNA 5,8S, um outro espaçador não codificante interno (ITS-2), uma região codificadora do rRNA 28S e, finalmente, um segmento intergênico espaçador não transcrito, IGS. Apesar do baixo número de cópias do rDNA em comparação ao kDNA, suas subunidades são bem exploradas no desenvolvimento de ferramentas moleculares para diagnóstico da LV. Os iniciadores R221, R332, R223 e R333 são os mais descritos na amplificação de regiões do SSU-rRNA (Silva et al., 2010).

Após o mapeamento gênico das Heat Shock Proteins (HSPs) ou proteínas do choque térmico, várias abordagens com PCR foram descritas utilizando este alvo (Garcia et al., 2004, Rafti et al, 2007). Estas proteínas são identificadas como os principais imunógenos em várias doenças

infecciosas (Arora et al., 2008), sendo a família da HSP70 comum em soro de pacientes com Leishmaniose (Arora et al., 2000). Recentemente, utilizando como alvo um fragmento de 234 pb da HsP70-234 bp e empregando a metodologia de PCR-RFLP, foi possível a identificação de todas as espécies de *Leishmania* associada com a LT circulantes no Brasil foi conseguido (Graça et al., 2012).

A principal glicoproteína presente na membrana celular das espécies de *Leishmania* é a gp63. Esta glicoproteína desempenha papel fundamental na virulência do parasito e na estimulação da resposta celular e humoral do hospedeiro (Hoya et al., 1999). Devido ao polimorfismo das regiões gênicas codificadoras dessa proteína, os produtos de amplificação podem ser distintos entre isolados do complexo *Donovani* (*L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani*), com especial atenção para as espécies do Mediterrâneo (*L. (L.) infantum* de diferentes origens geográficas), e em grupos separados do Velho Mundo (*L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica*), podendo-se aplicar a identificação de espécies e/ou linhagens pela restrição dos fragmentos por RFLP (Guerbouj et al., 2001; Elamin et al., 2008).

Recentemente, foi realizada a tipagem molecular do gene K26 que codifica uma proteína hidrofílica de superfície da *Leishmania*. O par de iniciadores K26f/K26r mostrou ser altamente específico para as espécies do complexo *Donovani*, podendo ainda discriminar *L. (L.) infantum* de *L. (L.) donovani* (Haralambous et al., 2008).

A identificação do DNA da *Leishmania* pode ser realizada simultaneamente ao processo de amplificação, técnica conhecida como PCR em tempo real (qPCR) ou através da detecção do produto amplificado pela PCR pelas técnicas de eletroforese em gel com coloração específica ou ainda pelo método de PCR-ELISA.

A reação de amplificação quantitativa em tempo real (qPCR) permite a quantificação e o monitoramento simultâneo do produto amplificado através do uso de corantes fluorescentes ou sondas de DNA marcadas com fluorocromos (Mary et al., 2004; Rolão et al., 2004). Um corante amplamente empregado é o SYBR Green I, que se liga de forma inespecífica ao DNA durante a amplificação. Outra maneira de gerar a fluorescência é usar uma sonda especificamente dirigida a uma região interna da sequência que será amplificada, e um exemplo deste sistema é a sonda TaqMan. Durante a amplificação, a sonda TaqMan é degradada e ocorre a emissão de luz. A análise da emissão de luz é feita através de um detector de sinal que cria um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo de PCR, e o sinal

gerado reflete a quantidade de produto formado (Paiva-Cavalcanti et al., 2010). Diversos autores já utilizaram esta técnica para o diagnóstico da LV em amostras de sangue periférico com diferentes finalidades: monitoramento da carga parasitária, diagnóstico clínico e acompanhamento de esquemas terapêuticos (Mary et al., 2004; Mortarino et al., 2004; Rolão et al., 2004; Aoun et al., 2009). Esta técnica apresenta elevada sensibilidade e especificidade, permitir a quantificação da carga parasitária e a avaliação de um elevado número de amostras simultaneamente (Mary et al., 2004; Rolão et al., 2010). Por outro lado, a técnica utiliza equipamentos específicos e de elevado custo, que exigem profissional tecnicamente qualificado, o que dificulta a sua implantação nos laboratórios de saúde pública.

A eletroforese em gel para detecção do produto de PCR consiste na separação de moléculas com carga elétrica não nula, geralmente usada para separar proteínas e moléculas de DNA e RNA. Durante a aplicação de uma diferença de potencial assiste-se à migração de partículas que originam um conjunto de bandas. A visualização destas bandas em géis de agarose é realizada através de radiação ultravioleta e só é possível devido à adição de um composto apropriado que, ao interagir com o DNA, se torna fluorescente. A seleção do composto é determinante, na medida em que uns compostos se ligam preferencialmente ao DNA em vez do RNA e outros mostram maior afinidade ao DNA de cadeia dupla face ao de cadeia simples. O brometo de etídio é um exemplo de um composto fluorescente, que apresenta características mutagênicas e que é largamente utilizado para a detecção de DNA em géis (Pelt-Verkuil et al., 2008; Oliveira, 2010). Para géis de poliacrilamida o corante utilizado para a visualização das bandas de fragmentos de DNA amplificado é o nitrato de prata. O tamanho do produto é depois estimado por comparação das bandas com marcadores de tamanhos moleculares previamente conhecidos (Chen & Janes, 2002; Pelt-Verkuil et al., 2008). As desvantagens destes métodos se referem principalmente à subjetividade da leitura e à limitação do número de amostras a serem analisadas, além do inconveniente de requerer a manipulação de agentes carcinogênicos e tóxicos (corantes, tais como o brometo de etídio, o nitrato de prata e a acrilamida).

Desde a sua descrição inicial em 1991, a tecnologia de PCR-ELISA está sendo avaliada como alternativa aos métodos de PCR convencionais e qPCR. Nessa técnica, o produto amplificado da PCR é detectado por meio de um ensaio imunoenzimático, não ocorrendo necessidade da separação por eletroforese ou hibridização com sondas radioativas (Landgraf et al., 1991). Outras vantagens do método são a interpretação objetiva dos resultados, a análise de grandes quantidades de amostras clínicas simultaneamente, com baixo índice de contaminação da

reação e o uso de equipamentos amplamente utilizados para processamento de séries de ELISA, o que torna a técnica economicamente mais acessível que o ensaio de PCR em tempo real (Rolão et al., 2004; Gomes et al., 2010). Existem numerosos exemplos de aplicações em diagnósticos de doenças bacterianas (Luk et al., 1997; Hong et al., 2003; Moratta et al., 2003; Santos et al., 2008), doenças fúngicas (Jones et al., 1998), doenças virais (Nozawa et al., 2010; Raji et al., 2011; Tahk et al., 2011); doenças parasitárias (Hassan et al., 2005; Cabrera et al., 2009; Gomes et al., 2010), além de outras doenças (Akhtar et al., 2012; Huang et al., 2012; Palermo et al., 2012).

O princípio da técnica de PCR-ELISA baseia-se em seis etapas principais: 1) captura do produto amplificado e marcado com biotina na extremidade 5' à placa de poliestireno recoberta com estreptavidina; 2) desnaturação do produto de amplificação com conseqüente separação da fita não marcada; 3) hibridização da sonda marcada com fluoresceína na extremidade 5' e complementar à fita simples de DNA que se encontra aderida à placa; 4) ligação de um conjugado enzimático (anticorpo anti-fluoresceína + peroxidase); 5) adição de uma mistura substrato-cromógeno e 6) quantificação da absorbância em leitor de ELISA. A medida de absorbância da solução é proporcional à intensidade do produto cromático formado, que por sua vez depende da quantidade de DNA amplificado. Ainda, o valor de leitura da absorbância (A) após estabelecimento de um ponto de corte reflete a presença ou a ausência do DNA do parasito (Vesänen et al., 1996).

Nos últimos quinze anos a técnica de PCR-ELISA vem sendo desenvolvida para o diagnóstico de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani*. O primeiro ensaio de PCR-ELISA para o diagnóstico da LV foi desenvolvido por Costa et al. (1996) na França. Este ensaio apresentou índices de 98% de sensibilidade e 100% de especificidade. No estudo foram avaliados 13 pacientes com a co-infecção *Leishmania*/HIV (nove amostras de aspirado de medula óssea e 44 amostras de sangue periférico) e 79 pacientes apenas infectados com HIV, (33 amostras de aspirado de medula óssea e 46 amostras de sangue periférico). O ensaio utilizou, como alvo, a região do SSU rDNA para amplificação e detecção do DNA de *L. (L.) donovani*. Para revelação do ensaio foi utilizado um kit comercial (DIG Detection, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) que atualmente não é mais produzido.

Em 2001, Martín Sánchez et al. desenvolveram um ensaio de PCR-ELISA para o diagnóstico das leishmniaoses (visceral e tegumentar), no qual utilizou como alvo molecular o kDNA, e para revelação do ensaio o kit comercial DIG Detection (Boehringer Mannheim). O ensaio foi

avaliado com 33 amostras de cultura de *L. (L.) infantum*, além de DNA de amostras referências de *L. (L.) donovani*, *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) mexicana* e *Trypanosoma cruzi*. Foram analisados três pacientes com a co-infecção *Leishmania*/HIV (três amostras de sangue periférico e três lâminas de esfregaço de aspirado de medula óssea), sete pacientes suspeitos de LT (quatro amostras de fragmentos de biópsia de pele e de três raspados de borda de lesão), bem como 31 cães sintomáticos (21 amostras de aspirado de medula óssea, de 28 amostras de sangue periférico, de 18 amostras de aspirado de linfonodo e de três amostras de pele, sendo que várias amostras eram provenientes de um mesmo cão). Foram utilizadas duas amostras de DNA extraídas de sangue periférico de adultos sadios como controles. Todas as amostras eram provenientes de indivíduos e cães da região endêmica de Granada, sul da Espanha. Os pacientes portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV, obtiveram resultados positivos no ensaio de PCR-ELISA e negativos na hemocultura, utilizando amostras de sangue periférico, e negativos no exame parasitológico direto de esfregaço de medula óssea. Todos os pacientes suspeitos de LT foram positivos no ensaio de PCR-ELISA, somente um paciente teve seu resultado confirmado pelo cultivo do fragmento de biópsia de pele e dois pacientes foram confirmados pelo exame parasitológico direto. Para os cães, 16 amostras obtiveram resultados concordantes nos ensaios de PCR-ELISA, RIFI e cultura e outras 12 amostras foram negativas em cultura e positivas nas outras duas técnicas. A concordância para as amostras de aspirado de linfonodo e sangue periférico para PCR-ELISA foi de 100% e de sangue periférico e medula óssea foi de 88,2%. O ensaio demonstrou ser 100% específico para *L.(L.) infantum* nas amostras referência analisadas.

Martín Sánchez et al. (2002) aprimoraram o ensaio anteriormente desenvolvido de PCR-ELISA para identificar *L. (L.) infantum*. O ensaio foi avaliado em 76 amostras (22 amostras de sangue periférico, 36 amostras de aspirado de medula óssea e 18 amostras de pele) de 72 pacientes residentes de área endêmica na Espanha. Estas amostras eram de 24 casos suspeitos de LV (13 pacientes portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV e 11 pacientes portadores somente da LV), 32 indivíduos HIV positivos não portadores de LV e 16 indivíduos suspeitos de LT e HIV negativos. Todos os indivíduos eram residentes da província de Granada, sul da Espanha. O ensaio de PCR-ELISA para leishmaniose apresentou concordância de 83% para amostras de pele, 100% para amostras de sangue e 67% para aspirado de medula óssea, quando comparado com a combinação de técnicas de diagnóstico: esfregaço de medula óssea corado com Giemsa, cultura e RIFI.

Doncker et al. (2005) desenvolveram um ensaio de PCR-ELISA para determinar cargas

parasitárias baixas em pacientes com LV, mas HIV negativos. O estudo utilizou amostras de sangue periférico de 56 pacientes sintomáticos casos de LV e 39 controles (pacientes não diagnosticados para LV e com confirmação de outras doenças). Todos os pacientes eram de Dharan, área endêmica do leste do Nepal. Também como controles foram utilizadas amostras de sangue periférico de 28 indivíduos doadores de sangue, moradores de região não-endêmica da Bélgica. Em todas as amostras foram realizados os ensaios de PCR-ELISA e PCR convencional. O ensaio de PCR-ELISA utilizou como alvo molecular uma região do SSU-rDNA e um método de revelação do produto amplificado na PCR em que a microplaca de ELISA foi sensibilizada com a sonda de hibridização. Foram realizados dois ensaios de PCR convencional com revelação em gel de agarose, um ensaio utilizava como alvo molecular a mesma região amplificada no ensaio de PCR-ELISA e o outro a região conservada do kDNA de *Leishmania*. O ensaio de PCR-ELISA obteve maior sensibilidade (83,9%) se comparado ao ensaio de PCR convencional (73,2%), especificidade de 100% quando avaliado com indivíduos saudáveis que nunca viajaram para área endêmica e 87,2%, utilizando indivíduos controles de área endêmica para LV. O ensaio de PCR-ELISA também foi avaliado em quatro pacientes que não possuíam clínica para LV e resultado negativo no exame parasitológico direto do esfregaço de medula óssea, mas eram positivos para o DAT. Neste grupo de pacientes o ensaio de PCR-ELISA, bem como o PCR convencional foram positivos para todos os pacientes.

Em 2008, foi realizado um inquérito epidemiológico em que foram avaliadas as capacidades de diferentes testes para detectar *L. (L.) infantum* em 388 indivíduos assintomáticos provenientes de uma região endêmica do Iran. Foram avaliados os testes de PCR-ELISA, intradermorreação e RIFI em amostras de sangue periférico de todos os indivíduos. Para a realização do ensaio de PCR-ELISA foi utilizado o kit de PCR-ELISA DIG Detection (Roche Diagnostic) e o alvo selecionado foi o kDNA. Os métodos de PCR-ELISA, intradermorreação e RIFI foram positivos, respectivamente, em 24,5%, 34% e 54,6% dos indivíduos. Os autores não apontam nenhum teste como confirmatório para LV e concluem que o ensaio de PCR-ELISA não é um bom teste confirmatório para diagnosticar assintomáticos, sugerindo a associação das três metodologias para a avaliação deste grupo de indivíduos (Alborzi et al., 2008).

O mais recente ensaio de PCR-ELISA foi descrito por Kobets et al. (2010). Esse ensaio utilizou iniciadores marcados com digoxigenina e biotina, o que eliminou o uso de sonda de hibridização. O produto foi detectado usando um ensaio de ELISA sanduíche com anticorpos

anti-digoxigenina. Como alvo molecular foi usado iniciadores complementares a região conservada do kDNA. A sensibilidade da técnica foi de 0,3fg de DNA de parasita por reação. O ensaio não foi validado em amostras clínicas e tem a limitação de favorecer resultados falsos positivos devido à probabilidade de detecção de dímeros de iniciadores.

Até o momento, diferentes ensaios de PCR-ELISA foram desenvolvidos para o diagnóstico da LV humana, porém alguns ensaios foram avaliados somente em um grupo de pacientes (imunossuprimidos ou imunocompetentes), não possibilitando sua validação para o diagnóstico clínico. Já outros ensaios não foram desenvolvidos para detectar especificamente agentes causadores da LV, o que desfavorece o seu uso em ações de vigilância e controle da doença. Existem ainda ensaios que não utilizaram amostras realmente padronizadas para a etapa de validação ou não possuem validação. Além disso, muitos ensaios utilizaram kits comerciais para revelação dos produtos amplificados na PCR que não estão mais comercialmente disponíveis. A partir deste cenário, o presente estudo objetivou desenvolver e validar um ensaio de PCR-ELISA para o diagnóstico da LV. Este ensaio é semi-quantitativo, utiliza como alvo molecular o kDNA, o que garante a alta sensibilidade para o teste e é específico para LV, pois usa como sonda um fragmento de DNA específico para o complexo *Donovani*. O ensaio foi padronizado com cepa referência para *L. (L.) infantum* e um banco de amostras caracterizadas por técnicas consideradas como padrão-ouro para o diagnóstico da LV; não faz uso de kits comerciais para a revelação dos produtos amplificados pela PCR e foi validado em diferentes grupos clínicos com indivíduos de diferentes faixas etárias, o que assegura o amplo uso do método para o diagnóstico da LV humana.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Parte I – Desenvolvimento do ensaio de PCR-ELISA

4.1.1 Material biológico

A) Amostras de cultura

Amostras referências de culturas de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV), *L. (L.) donovani* (MHOM/ET/196/HU3), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147) e *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH-8) foram cultivadas em meio Schneider (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, São Paulo, Brasil). A contagem de parasitos/mL foi realizada em câmara de Neubauer quando estabelecida a fase estacionária de crescimento. Uma alíquota de 1mL da suspensão de parasitos foi submetida a centrifugação 2.300g por 2 minutos e armazenada a -70°C para posterior extração de DNA genômico.

B) Amostras de sangue periférico

Amostras de pacientes casos de LV e de indivíduos não infectados, pertencentes a um banco de amostras do Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC) do CPqRR que estavam estocadas a -20°C :

Casos de LV: foi constituído por amostras de sangue periférico de 14 pacientes do projeto: “Validação de teste rápido para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana”, com aprovação no CEP/CPqRR, nº13/2003. O grupo de estudo foi constituído por pacientes com média de idade de 12,7 anos, variando de um mês a 76,8 anos, todos moradores de áreas endêmicas para LV que procuraram os centros de pesquisa participantes no estudo (Universidade Federal da Maranhão (UFMA), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador-BA (CPqGM), Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte-MG (CPqRR)), apresentando as seguintes condições: febre acompanhada de pelo menos uma das seguintes alterações: a) esplenomegalia, b) hepatomegalia, c) anemia, d) leucopenia ou e) plaquetopenia. Todos os pacientes considerados casos de LV tiveram comprovação parasitológica pela demonstração de amastigotas de *Leishmania* spp. em esfregaço corado ou de promastigotas de *Leishmania* spp. em cultivo de aspirado de medula óssea.

Indivíduos não infectados: foi constituído por amostras de 11 voluntários sadios, moradores de área endêmica para LV e provenientes do projeto: “Validação da reação em cadeia da polimerase (PCR) em sangue periférico para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana”, com aprovação no CEP/CPqRR, nº24/2009.

C) Amostras de sangue periférico adicionadas de parasitos

As 11 amostras de sangue periférico, obtidas de indivíduos não infectados foram adicionadas de cultura da amostra referência de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) obtenção a concentração de 10.000 parasitas/mL de sangue. A partir desta concentração foram realizadas diluições sucessivas, obtendo variações de 10.000, 1.000, 100, 10 e 1 parasito/ml de sangue.

O uso destas amostras no projeto atual foi aprovada no CEP/CPqRR, nº 14/2011.

4.1.2 Extração de DNA

As amostras de cultura de parasitos, bem como as amostras de sangue periférico adicionadas de parasitos e não adicionadas (casos de LV e indivíduos não infectados) foram submetidas à extração do DNA com o uso do kit “QIAamp DNA mini” (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante. Controles negativos da extração de DNA foram realizados para cada ensaio mediante a adição de todos os reagentes, exceto a amostra. O rendimento da extração foi determinado por meio da leitura da absorbância a 260nm em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). A razão de absorbância A_{260}/A_{280} foi analisada para verificar a pureza do DNA obtido.

4.1.3 Desenvolvimento do ensaio de PCR-ELISA kDNA

A) Reação de PCR

Reação de amplificação para o alvo kDNA-120 pares de base: a reação foi preparada para o volume final de 25µl, contendo 2µl de amostra de DNA, 2 unidades de Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 1X PCR Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCL), iniciador senso: 150 (5'-GGGG/TAGGGGCGTTCTC/GCGAA-3') marcado com

biotina a 5' e anti-senso:152 (3'C/GC/GC/GA/TCTATA/TTTACACCAACCCC-5') (Volpini et al., 2004) a 0,6µM cada, 2,0mM MgCl₂ e 0,2mM dNTP (Promega, WI, EUA). O programa de ciclagem consistiu de uma etapa a 95° C por 5min, seguida de 34 ciclos a 95° C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Uma etapa final de 72° C por 5 minutos foi realizada. Cada ensaio incluiu controle da PCR (mix da PCR sem o DNA) e demais controles negativos (controle negativo do processo de extração de DNA e DNA extraído de amostras de voluntários sadios) e amostras controles positivos (DNA genômico extraído da amostra referência de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV)).

B) Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos de amplificação oriundos do DNA das amostras de culturas de parasitos, de sangue periférico adicionadas de parasitos e não adicionadas (casos de LV e indivíduos sadios) foram fracionados (5µL de cada amostra) por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e visualizados pela coloração com nitrato de prata.

C) Reação de ELISA

Construção da sonda: Para o ensaio de ELISA para detecção do alvo kDNA-120 pares de bases foi construída uma sonda 5'-GATTTCTGCACCCATTTTTC-3' marcada com fluoresceína na extremidade 5'. A sonda foi desenvolvida utilizando-se o programa Web-Primer3 0.4.0 e a busca por homologia foi realizada por meio do programa BLAST (*National Center for Biotechnology Information website*), utilizando o banco de dados de nucleotídeos e a opção Megablast (Rozen e Skaletsky, 2000).

Ensaio de ELISA: A detecção colorimétrica dos produtos amplificados foi padronizada com a amostra de referência de cultura de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) nas concentrações de 700pg/µL, 700fg/µL, 0,7fg/µL e 0,07fg/µL e seguindo parâmetros dos estudos de Lüneberg et al., (1993) e Gomes et al., (2010). Foram analisados os seguintes parâmetros para padronização do ensaio:

- Concentração de estreptavidina para sensibilização da microplaca: 2,5 e 5,0µg/mL;
- Diluição do produto amplificado (controles e amostras) na microplaca sensibilizada: 10:90, 5:95 e 4:96;

- Solução de hibridização: solução de Ficoll (0,6M NaCl; 20mM fosfato de sódio pH 7.4; 1mM EDTA; 0,02% Ficoll; 0,02% polyvinypyrrolidone; 0,02% BSA) e solução de Formamida (SSPE5x 70%, Formamida 30%, 0,1%SDS);
- Concentração da sonda: 0,2 e 0,4pmol/mL;
- Marca de anticorpo anti-fluoresceína conjugado a peroxidase: anticorpo IgG de coelho anti-fluoresceína Oregon Green[®] conjugado a peroxidase (Invitrogen, Califórnia, EUA) e anticorpo monoclonal de camundongo anti-fluoresceína conjugado a peroxidase (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA).
- Concentração do anticorpo anti-fluoresceína conjugado a peroxidase: 1/1000, 1/3000, 1/5000, 1/7000, 1/9000 e 1/11000.

4.1.4 Padronização do ensaio de PCR-ELISA kDNA

A) Determinação do limite entre positividade e negatividade (*cut-off*) da reação:

Após o desenvolvimento do ensaio de PCR-ELISA kDNA, as amostras de sangue periférico de 14 casos de LV e de 11 indivíduos não infectados foram utilizadas para determinação do limite entre positividade e negatividade (*cut-off*) através da seguinte reação de ELISA padronizada:

Sensibilização e bloqueio da microplaca: orifícios de microplacas de poliestireno MaxiSorp[®] (ThermoScientific Nunc, Vernon Hills, Illinois, EUA) foram sensibilizados com 100µL de estreptavidina (Streptoavidin from Streptomyces avidinii, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluída numa concentração de 5µg/mL em solução tampão PBS 1X, incubando-se em câmara úmida a 37°C por uma hora e seguindo por outra incubação em geladeira (2 a 8°C) por 18 horas . Após este período, os orifícios foram lavados quatro vezes com 400 µL PBS-Tween 0,05% (PBS-T) e incubados com 200µL de solução de 3% de soro albumina bovina (BSA) em PBS-T a 37°C, por duas horas. Para finalizar, os orifícios foram lavados quatro vezes com 400 µL PBS-T e as microplacas foram armazenadas em congelador -20°C, até o momento de uso.

Ensaio de ELISA: na microplaca revestida com 5µg/mL de estreptavidina foram afixados os produtos biotinilados oriundos da amplificação por PCR. Esses produtos foram solubilizados

em PBS 1X na diluição de 4:96, totalizando um volume final de 100µL. A microplaca foi incubada a 37°C por 30 minutos. Em seguida, os poços da microplaca foram lavados três vezes com 300µL de PBS-T 0,05%. Posteriormente, adicionou-se 100µL de NaOH 0,1mol/L com incubação por mais 10 minutos a temperatura ambiente para ocorrer desnaturação das fitas duplas de DNA. Os poços da microplaca foram lavados uma vez com 300µL de NaOH 0,1mol/L e três vezes com 300µL de Tris-HCl 0,1mol/L. Foi adicionado 100 µL de solução de hibridização (SSPE5X 70%, Formamida 30%, 0,1% SDS com 0,2 pMol da sonda marcada com fluoresceína na extremidade 5') em cada poço e incubado por uma hora a 37°C. A microplaca foi lavada três vezes com solução de SSC 6X (0,9M NaCl e 0,09M de citrato de sódio) e duas vezes com solução de SSC 3X (0,45M NaCl e 0,045M de citrato de sódio) com 0,1% de SDS. A seguir, 150µL da solução contendo 1% de BSA em PBS 1X foram adicionados e a microplaca incubada por 30 minutos a 37°C. Após esse período, o anticorpo IgG de coelho anti-fluoresceína Oregon Green® conjugado a peroxidase (Invitrogen, Califórnia, EUA) diluído 1:9000 em solução contendo 1% de BSA em PBS 1X foi adicionado no volume de 150µL em cada poço da microplaca, com incubação por uma hora a 37°C. Posteriormente os poços da microplaca foram lavados quatro vezes com 300µL de PBS-T 0,05%. O volume de 100µL de TMB (3,3', 5, 5'- tetrametilbenzidina) foi adicionado em cada poço com incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. A reação foi paralisada com a adição de 100µL de ácido sulfúrico 3N e realizada a leitura em leitor de microplaca a 450nm.

B) Análise da especificidade analítica

Isolados referência de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV), *L. (L.) donovani* (MHOM/ET/196/HU3), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147) e *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH-8) foram usados para avaliação de especificidade analítica do ensaio PCR-ELISA kDNA.

C) Determinação do limite de detecção do ensaio

O limite de detecção do ensaio de PCR-ELISA kDNA foi determinado – pela menor concentração (massa) detectada do DNA genômico da amostra referência de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV), diluído em série (1:10). Foi também determinada a menor concentração de parasitos/mL de sangue periférico detectada pelo ensaio, utilizando 11 amostras de sangue periférico de indivíduos não infectados, adicionadas de parasitos em diferentes concentrações da cultura da amostra referência *L. (L.) infantum* (1, 10, 100, 1.000,

10.000 parasito/ml).

D) Determinação das medidas de precisão.

Como medidas de precisão foram determinados os coeficientes de variação (CV: desvio padrão/média x 100%) intra-ensaio (repetibilidade) e inter-ensaio (reprodutibilidade). Para a análise da repetibilidade foram avaliados, em um mesmo ensaio, quatro amostras de DNA de cultura de *L. (L.) infantum* nas concentrações 700pg/ μ L, 70fg/ μ l, 0,7fg/ μ L e 0,07fg/ μ L, quatro amostras de DNA total extraídas de sangue periférico de casos de LV e quatro amostras de DNA total extraídas de sangue periférico de indivíduos controles.

Para análise da reprodutibilidade, as mesmas amostras foram realizadas em duplicata em quatro ensaios distintos.

4.1.5 Desenvolvimento do ensaio de PCR-ELISA ACTB humano

A) Reação de PCR

Reação de amplificação do gene humano ACTB: como controle do procedimento de extração de DNA e de amplificação, todas as amostras foram amplificadas para o gene humano codificador para a β -actina, utilizando os iniciadores Aco1 (5'-ACCTCATGAAGATCCTCACC-3') marcado com biotina a 5' e Aco2 (5'-CCATCTCTTGCTCGAAGTCC-3') (Musso et al., 1996), que geram um produto de 120 pares de bases. Resumidamente, a reação foi preparada para um volume final de 20 μ l, contendo 2 μ l de amostra de DNA, 2 unidades de Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 1X PCR Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCL), 0,5 μ M de cada iniciador, 2,0 mM MgCl₂ e 0, 2 mM dNTP (Promega, WI, EUA). O programa de ciclagem consistiu de uma etapa inicial de 95° C por 5 minutos e 35 ciclos a 95 °C por 20 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Uma etapa final de 72° por 6 minutos foi realizada. Cada ensaio incluiu controle da PCR (mix da PCR sem o DNA) e controle negativo (controle negativo do processo de extração de DNA).

B) Reação de ELISA

Construção Sonda da reação de ELISA para detecção do gene humano ACTB: para o ensaio de ELISA foi utilizada a sonda 5'-TCTCCTTAATGCACGCACG-3' marcada com fluoresceína a 5'. A sonda foi desenvolvida por Gomes et al. (2010) utilizando-se o programa Web-Primer3 0.4.0 e a busca por homologia foi realizada por meio do programa BLAST (*National Center for Biotechnology Information website*), utilizando o banco de dados de nucleotídeos e a opção Megablast (Rozen e Skaletsky, 2000).

Ensaio de ELISA: A detecção colorimétrica dos produtos amplificados foi padronizada com quatro amostras de indivíduos não infectados, a partir do ensaio desenvolvido e padronizado para o ensaio de PCR-ELISA kDNA. Foram analisados os seguintes parâmetros para padronização do ensaio:

- Diluição do produto amplificado (controles e amostras) na microplaca sensibilizada: 10:90 e 5:95;
- Concentração do anticorpo: 1/1000, 1/1500 e 1/2000.

4.1.6 Padronização do ensaio de PCR-ELISA ACTB

A) Determinação do limite entre positividade e negatividade (*cut-off*) da reação:

Após o desenvolvimento do ensaio de PCR-ELISA ACTB, as amostras de sangue periférico de 14 casos de LV e de 11 indivíduos não infectados foram utilizadas para determinação do limite entre positividade e negatividade (*cut-off*) através da seguinte reação de ELISA padronizada:

Sensibilização e bloqueio da microplaca: a microplaca MaxiSorp[®] (ThermoScientific Nunc, Vernon Hills, Illinois, EUA) foi realizada conforme item 4.1.4 A

Ensaio de ELISA: na microplaca revestida com 5µg/mL de estreptavidina foram afixados produtos biotinilados oriundos da amplificação por PCR. Esses produtos foram solubilizados em PBS 1X na diluição de 10:90, totalizando um volume final de 100µL. A microplaca foi incubada a 37°C por 30 minutos. Em seguida, os poços da microplaca foram lavados três vezes com 300µL de PBS-T 0,05% . Posteriormente, adicionou-se 100µL de NaOH 0,1mol/L com incubação por mais 10 minutos a temperatura ambiente para ocorrer desnaturação das fitas duplas de DNA. Os poços da microplaca foram lavados uma vez com 300µL de NaOH

0,1mol/L e três vezes com 300µL de Tris-HCl 0,1mol/L. Os poços da microplaca foram lavados uma vez com 300µL de NaOH 0,1mol/L e três vezes com 300µL de Tris-HCl 0,1mol/L. Foi adicionado de 100 µL de solução de hibridização (SSPE5X 70%, Formamida 30%, 0,1%SDS com 0,2 pMol da sonda marcada com fluoresceína na extremidade 5') em cada poço e incubado por uma hora a 37°C. A microplaca foi lavada três vezes com solução de SSC 6X (0,9M NaCl e 0,09M de citrato de sódio) e duas vezes com solução de SSC 3X (0,45M NaCl e 0,045M de citrato de sódio) com 0,1% de SDS. A seguir, 150µL da solução contendo 1% de soro BSA em PBS 1X foram adicionados e a microplaca incubada por 30 minutos a 37°C. Após esse período, o anticorpo IgG de coelho anti-fluoresceína Oregon Green® conjugado a peroxidase (Invitrogen, Califórnia, EUA) diluído 1:1000 em solução contendo 1% de BSA em PBS 1X foi adicionado no volume de 150µL em cada poço da microplaca, com incubação por uma hora a 37°C. Posteriormente os poços da microplaca foram lavados quatro vezes com 300µL de PBS-T 0,05%. O volume de 100 µL de TMB (3, 3, 5, 5'- tetrametilbenzidina) foi adicionado em cada poço com incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. A reação foi paralisada com a adição de 100 µL de ácido sulfúrico 3N e realizada a leitura em leitor de microplaca a 450 nm.

4.1.7 Análise dos dados

O limite entre positividade e negatividade (*cut-off*) do ensaio PCR-ELISA kDNA foi determinado por análise de Curva ROC (área sobre a curva) das leituras dos ensaios realizados com amostras de indivíduos portadores de LV e indivíduos não infectados, utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA).

Por meio do valor do *cut-off* estabelecido e das leituras de absorvância das amostras de cultura de *L. (L.) infantum*, *L. (L.) donovani*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonenses* foi analisada a especificidade analítica do ensaio.

A concordância entre os resultados obtidos pelo ensaio de PCR-ELISA kDNA e PCR convencional kDNA com análise por eletroforese foi avaliada pelo índice *Kappa* (Shrout, 1998):

$$Kappa = (P \text{ observada} - P \text{ esperada}) / (1 - P \text{ esperada})$$

Onde:

P observada = concordância bruta e

$$P \text{ esperada} = [(a+b) (a+c)] + [(c+d) (b+d)] / (a+b+c+d)^2$$

Foram calculados os respectivos intervalos de confiança para o Kappa e o índice foi interpretado segundo a seguinte tabela de valores:

Kappa	Concordância
< 0,1	Ausente
0,10- 0,40	Fraca
0,41-0,60	Discreta
0,61-0,80	Moderada
0,81-1,0	Substancial

O *cut-off* do ensaio de PCR-ELISA ACTB foi definido pela média da absorvância dos controles negativos (controles do processo de extração de DNA total e mix da reação de PCR sem adição de DNA) acrescido de três desvios padrão.

4.2 Parte II- Determinação do desempenho do ensaio de PCR-ELISA kDNA no diagnóstico de diferentes grupos clínicos de LV

4.2.1 Cálculo de amostra

A amostra foi calculada considerando sensibilidade, especificidade e nível de confiança estimado de 95% e precisão de 7%, conforme fórmula para cálculo do intervalo de confiança de 95% ($p \pm 1,96\sqrt{p(1-p)/n}$, onde p é a especificidade ou sensibilidade e n o número de amostras).

De forma simplificada, o número mínimo de amostras casos de LV e indivíduos não infectados devem seguir a seguinte fórmula:

$n \geq (1,96)^2 p (1-p) / x^2$, onde n é o número de amostras, p é a especificidade ou sensibilidade estimada do teste (95%) e x , a precisão do ensaio (7%) (Banoo et al., 2006).

A especificidade e sensibilidade do teste foram estimadas através de valores médios encontrados na literatura de outros estudos em que utilizaram o método de PCR para o diagnóstico de LV utilizando como material biológico sangue periférico (Wu et al., 1997; Disch et al., 2003; Maurya et al., 2005).

De acordo com a fórmula seriam necessários no mínimo 38 casos de LV e 38 controles não infectados.

4.2.2 Material biológico

O material biológico estudado pertence ao banco de amostras do Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC) do CPqRR e está estocado em freezer -20°C. Este material é constituído de DNA total extraído de sangue periférico de pacientes portadores de LV, pacientes portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV e moradores de área endêmica, em sua maioria da região metropolitana de Belo Horizonte. As amostras foram colhidas durante a realização de projetos de pesquisas já finalizados ou ainda vigentes, citados a seguir:

A) Grupo de amostras de pacientes portadores de LV:

O grupo foi constituído por 105 amostras de sangue coletadas de pacientes portadores de LV, sendo 81 crianças e 24 adultos.

As crianças eram pacientes internados no Hospital João Paulo II, rede FHEMIG (Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais), da cidade de Belo Horizonte- MG, com idade variando de três meses a dez anos (mediana de 30 meses) e pertenciam aos grupos de estudos dos projetos “Correlação entre parâmetros clínicos, resposta imune e parasitismo em crianças portadoras de leishmaniose visceral”, com aprovação no CEP/CPqRR, nº 10/2011 e “Estudo Multicêntrico de eficácia e a segurança dos fármacos recomendados para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil”, com aprovação no CEP/CPqRR, nº 16/2010.

Os adultos eram pacientes do Hospital Eduardo de Menezes, rede FHEMIG, da cidade de Belo Horizonte - MG, com idade variando de 18 a 68 anos (mediana de 36 anos) e pertenciam ao grupo de estudo do projeto “Intensidade de infecção, persistência parasitária e perfil imune como preditores de evolução clínica de leishmaniose visceral entre pacientes infectados ou não pelo HIV”, aprovado no CEP/CPqRR, nº 02/2011.

Critério de diagnóstico da infecção:

Os indivíduos portadores da LV foram caracterizados como portadores da infecção por apresentar febre superior a 37,8°C com duração igual ou superior a uma semana, associada à hepatoespleomegalia (borda hepática > 2 cm do bordo costal direito - BCD) ou esplenomegalia (borda esplênica ultrapassando o bordo costal esquerdo - BCE). Aos critérios clínicos foram associados no mínimo um dos seguintes exames laboratoriais com resultado positivo:

- Pesquisa direta de amastigotas de *Leishmania* spp. no esfregaço de medula óssea (MO);
- Cultura positiva para promastigotas de *Leishmania* spp. a partir de aspirado de MO ou biópsia de outro órgão, de acordo com indicação clínica;
- Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em soro com título maior ou igual a 1/80 e evolução satisfatória após tratamento com leishmanicida;
- Teste imunocromatográfico de antígeno rK39 em sangue periférico e evolução satisfatória após tratamento com leishmanicida.

B) Grupo de amostras de pacientes portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV

O grupo foi constituído de amostras 25 indivíduos portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV, com idade variando de 21 a 61 anos (mediana de 41anos) e pertence ao mesmo projeto dos

adultos portadores de LV citado anteriormente.

- Critério de diagnóstico da infecção:

Os pacientes portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV foram caracterizados como portadores da infecção pelos mesmos critérios dos pacientes portadores da LV descritos anteriormente.

C) Grupo de amostras de moradores de área endêmica

O grupo amostras de moradores de área endêmica foi constituído de 73 indivíduos, com mediana de idade de 37 meses, variando de 3 a 82 meses, todos residentes da região metropolitana de Belo Horizonte - MG, e pertencentes ao grupo de estudo do projeto “Avaliação da adequação e efetividade das estratégias do Programa de controle da leishmaniose visceral na Regional Noroeste de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil”, aprovado no CEP/CPqRR, nº 01/2010.

Este grupo de indivíduos foi selecionado através de inquérito epidemiológico e caracterizado através dos seguintes testes:

- Ensaio imunoenzimático (ELISA) com antígeno recombinante K39;
- Teste de aglutinação direta (DAT);
- Reação de PCR em tempo real (qPCR): amplificação da região do gene SSU-rRNA de *Leishmania* spp a partir do DNA total extraído de amostras de sangue periférico.

Dos 73 indivíduos selecionados, 33 (mediana de 34 meses, variando de 3 a 82 meses) foram caracterizados como assintomáticos por serem positivos em pelo menos um dos testes de diagnósticos para LV e 40 indivíduos (mediana de 42 meses, variando de 13 a 81 meses) foram caracterizados como não infectados (controles) por serem negativos em todos os ensaios.

A análise no projeto atual dos grupos de amostras especificados acima teve aprovação no CEP/CPqRR, nº 14/2011.

4.2.3 Reação de PCR kDNA e ACTB

As reações de PCR kDNA e ACTB seguiram os protocolos descritos previamente nos itens

4.1.3 A e 4.1.5 A, respectivamente.

4.2.4 Reação de PCR-ELISA kDNA e ACTB

A reação de PCR-ELISA kDNA e ACTB seguiram os protocolos descritos previamente nos itens 4.1.4 A e 4.1.6 A, respectivamente.

4.2.5 Análise dos dados

Foi construído um banco de dados no programa Excel 2007 com os resultados das amostras dos indivíduos portadores da LV, portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV e moradores de área endêmica.

Os valores de sensibilidade e especificidade foram calculados através da análise das leituras de absorbância do ensaio PCR-ELISA kDNA nas amostras de pacientes doentes (indivíduos portadores de LV e portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV) e indivíduos não infectados moradores de área endêmica. Foi calculada a taxa de positividade do ensaio nos indivíduos assintomáticos moradores de área endêmica. Foi utilizado o *cut-off* determinado na padronização do ensaio (parte I) e a classificação dos indivíduos seguiu o seguinte critério:

- Leitura de absorbância < *cut-off*: negativo e
- Leitura de absorbância \geq *cut-off*: positivo.

Através dos resultados das amostras de pacientes doentes e indivíduos assintomáticos moradores de área endêmica foi realizado uma análise pela Curva ROC, utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA), e foi determinado o valor limite entre os resultados indeterminados e positivos do ensaio PCR-ELISA kDNA, no qual foi possível sugerir uma faixa de absorbância que permitiu classificar algumas amostras como indeterminadas pelo ensaio de PCR-ELISA (Zona de Indeterminação).

Para análise do ensaio ELISA ACTB, os dados foram analisados através do *cut-off* obtido através da média dos controles negativos (controles da extração e mix) acrescido de três desvios padrão na padronização do ensaio de PCR- ELISA ACTB.

5.1 Parte I – Padronização do ensaio de PCR-ELISA (kDNA e ACTB humano)

5.1.1 Desenvolvimento do ensaio de ELISA kDNA

A) Sensibilização da microplaca MaxiSorp® (ThermoScientific Nunc)

A sensibilização da microplaca MaxiSorp® (Nunc) com estreptavidina foi avaliada nas concentrações de 2,5 µg/mL e 5,0 µg/mL. A concentração de 5,0 µg/ml de estreptavidina apresentou maior diferença entre as leituras de absorbância (A) nas amostras positivas e controles negativos analisados quando comparada com a concentração 2,5 µg/mL (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1. Leituras de absorbância (450nm) de acordo com duas concentrações de estreptavidina, usadas na sensibilização da microplaca de ELISA

Amostras	Concentração de estreptavidina	
	2,5 µg/mL	5 µg/mL
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 700pg/µl	0,852	1,871
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 700fg/µL	0,430	1,404
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 0,7fg/µl	0,193	0,504
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 0,07fg/µL	0,118	0,205
Controle Negativo 1	0,044	0,063
Controle Negativo 2	0,057	0,068
Branco	0,062	0,061
Branco	0,038	0,060

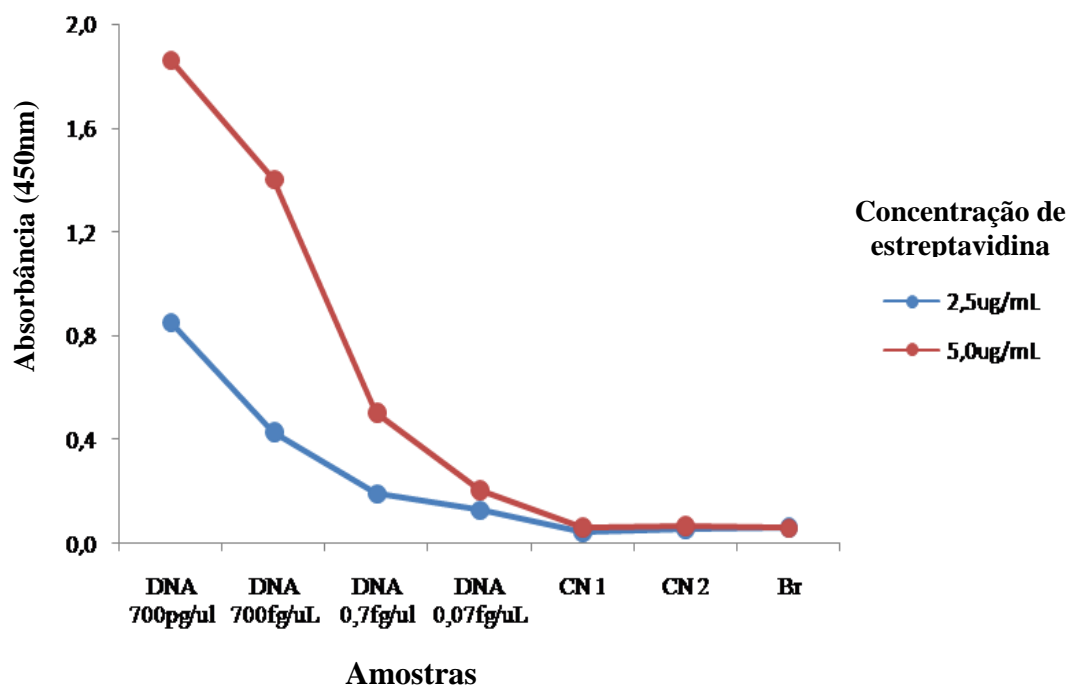


Figura 1. Comparação das leituras de absorbância obtidas no ensaio de PCR-ELISA kDNA com o uso de diferentes concentrações de estreptavidina na microplaca MaxiSorp[®] (ThermoScientific Nunc). CN: Controle negativo e Br: Branco.

B) Diluição do DNA amplificado das amostras/controles negativos na microplaca MaxiSorp[®] (ThermoScientific Nunc)

O ensaio de PCR-ELISA kDNA foi avaliado com diferentes diluições do DNA amplificado de amostras e controles negativos na microplaca MaxiSorp[®] (ThermoScientific Nunc). Foram testadas as diluições de 4:96, 5:95 e 10:90, para o volume final de 100µL.

A análise das leituras de absorbância nas diferentes diluições (4:96, 5:95 e 10:90) das amostras de DNA de *Leishmania*, bem como dos controles negativos e dos brancos, demonstrou que não houve diferenças (Figura 2). O ensaio foi padronizado com a diluição 4:96, de forma a otimizar o rendimento da reação de PCR.

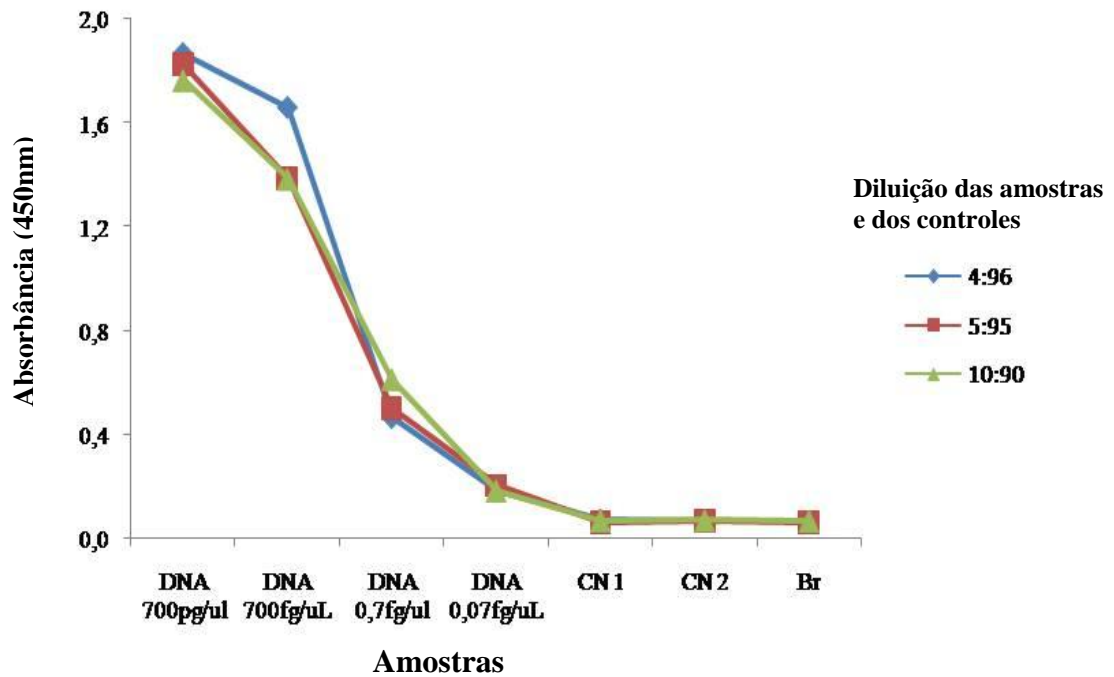


Figura 2. Comparação das leituras de absorbância no ensaio de PCR-ELISA kDNA com diferentes diluições do DNA amplificado das amostras e controles na microplaca MaxiSorp® (ThermoScientific Nunc). CN: Controle negativo e Br: Branco.

C) Solução de hibridização

O ensaio de PCR-ELISA kDNA foi avaliado com a solução de hibridização de Formamida (SSPE5X 70%, Formamida 30%, 0,1% SDS) e com a solução de hibridização de Ficoll (0,6M NaCl; 20mM fosfato de sódio pH 7,4; 1mM EDTA; 0,02% Ficoll; 0,02% polyvinylpyrrolidone; 0,02% BSA). A solução de hibridização de Ficoll apresentou leituras de absorbância das amostras e controles negativos mais altos, se comparado às leituras apresentada pelo ensaio quando se utilizou a solução de hibridização de Formamida. Porém ambos os testes apresentaram o mesmo limite de detecção do ensaio (Tabela 2 e Figura 3).

Tabela 2. Leituras da absorbância (450nm) de acordo com a solução de hibridização usada no ensaio de PCR-ELISA kDNA

Amostras	Solução de Hibridização	
	Ficoll	Formamida
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 700pg/μl	2,124	1,831
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 700fg/μL	2,166	1,633
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 0,7fg/μl	1,596	0,461
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 0,07fg/μL	0,663	0,178
Controle Negativo 1	0,254	0,070
Controle Negativo 2	0,148	0,066
Branco	0,062	0,065
Branco	0,056	0,062

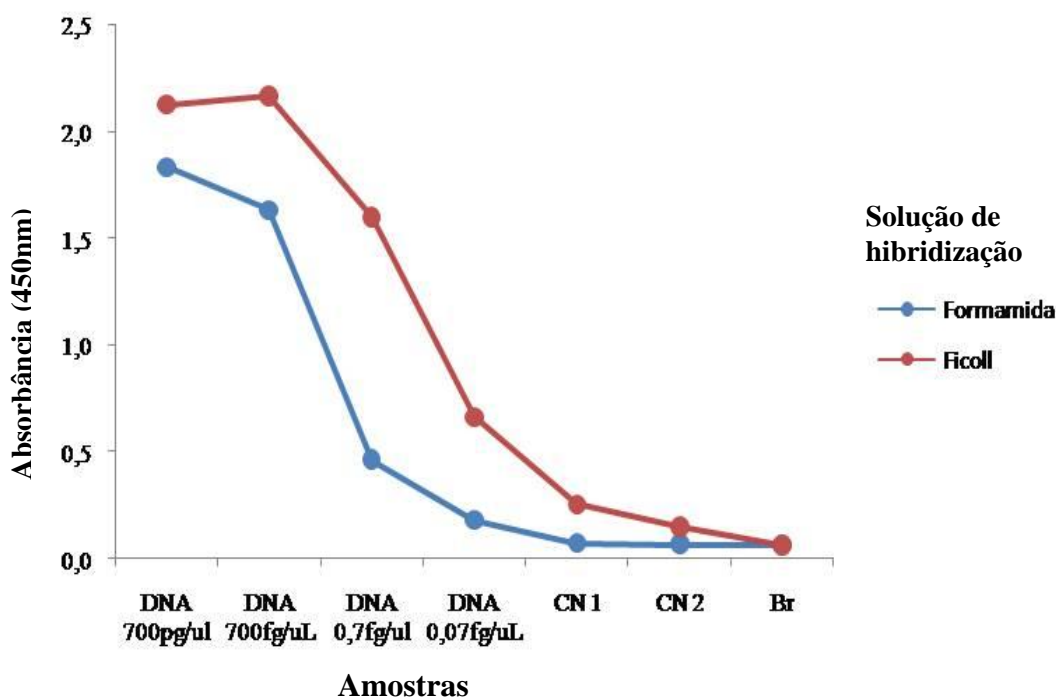


Figura 3. Comparação das leituras de absorbância no ensaio de PCR-ELISA kDNA com o uso de diferentes soluções de hibridização CN: Controle negativo e Br: Branco.

D) Concentração da sonda na solução de hibridização

Para padronização do ensaio de PCR-ELISA kDNA foram avaliadas duas concentrações de sonda diluídas na solução de hibridização: 0,2pMol e 0,4pMol.

Foram observados leituras das absorbâncias maiores das amostras de DNA amplificado de *L.(L.) infantum* e controles negativos com a solução de hibridização com sonda na

concentração de 0,4pMol. Ambas as concentrações de sonda foram capazes de diferenciar os valores de controles negativos e brancos das amostras de DNA amplificadas de *L.(L.) infantum* (Tabela 3 e Figura 4).

Tabela 3. Leituras de absorvância (450nm) de acordo com a concentração da sonda usada no ensaio de PCR-ELISA kDNA

Amostras	Concentração da Sonda	
	0,2pMol	0,4pMol
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 700pg/µl	1,831	2,132
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 700fg/µL	1,633	2,001
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 0,7fg/µl	0,461	0,934
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 0,07fg/µL	0,178	0,268
Controle Negativo 1	0,070	0,108
Controle Negativo 2	0,066	0,100
Branco	0,065	0,064
Branco	0,062	0,062

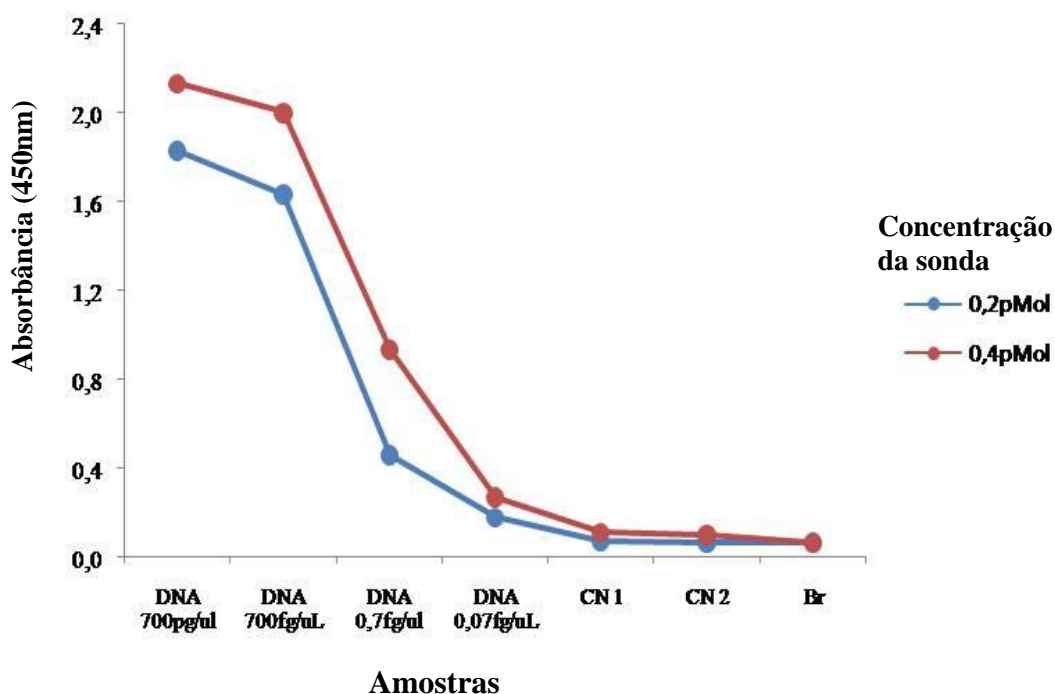


Figura 4. Comparação das leituras de absorvância no ensaio de PCR-ELISA kDNA com diferentes concentrações de sonda na solução de hibridização CN: Controle negativo e Br: Branco.

E) Comparação entre marcas comerciais de anticorpo anti-fluoresceína conjugado a peroxidase

Foram avaliadas duas marcas de anticorpo anti-fluoresceína conjugado a peroxidase na

padronização do ensaio de PCR-ELISA kDNA: anticorpo monoclonal de camundongo anti-fluoresceína conjugado a peroxidase (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) e anticorpo IgG de coelho anti-fluoresceína Oregon Green[®] conjugado a peroxidase (Invitrogen, Califórnia, EUA). A utilização do anticorpo da marca Millipore apresentou leituras de absorvâncias que não permitiram a distinção de DNA amplificado de amostras de cultura de *L. (L.) infantum* 0,07fg/uL e controles negativos (Tabela 4 e Figura 5).

Tabela 4. Leitura de absorvância (450nm) de acordo com as marcas dos anticorpos anti-fluoresceína conjugado a peroxidase usados no ensaio de PCR-ELISA kDNA

Amostras	Anticorpo (Marca)	
	Invitrogen	Millipore
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 700pg/μl	1,883	0,337
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 700fg/μL	1,670	0,319
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 0,7fg/μl	0,465	0,213
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 0,07fg/μL	0,181	0,199
Controle Negativo 1	0,071	0,239
Controle Negativo 2	0,067	0,241
Branco	0,066	0,216
Branco	0,063	0,202

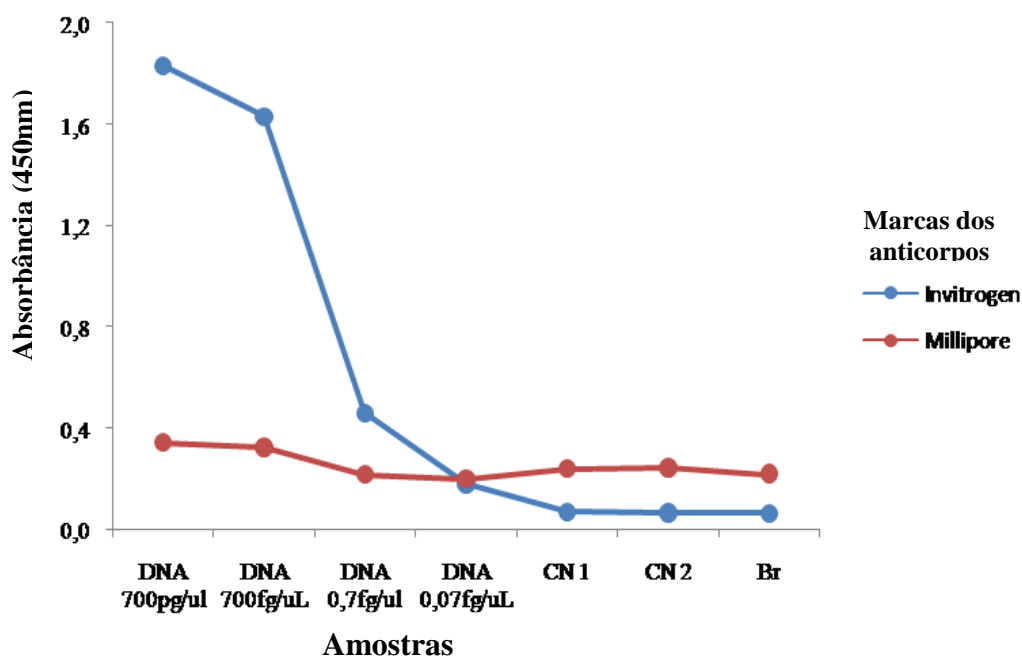


Figura 5. Comparação das leituras de absorvância no ensaio de PCR-ELISA kDNA com diferentes marcas de anticorpo anti-fluoresceína conjugado a peroxidase. CN: Controle negativo e Br: Branco.

F) Titulação do anticorpo anti-fluoresceína conjugado a peroxidase

Foi determinado o título do anticorpo anti-fluoresceína conjugado a peroxidase utilizado na reação de PCR-ELISA kDNA pelo uso das diluições: 1/1000, 1/3000, 1/5000, 1/7000, 1/9000 e 1/11000. O título de 1/9000 foi escolhido, pois, com esta diluição do anticorpo, ainda foi possível diferenciar as leituras de absorbâncias das amostras positivas dos controles negativos e brancos com melhor rendimento do reagente (Tabela 5).

Tabela 5. Leituras da absorbância (450nm) de acordo com a titulação do anticorpo anti-fluoresceína conjugado a peroxidase

Amostras	Diluição do anticorpo					
	1/1000	1/3000	1/5000	1/7000	1/9000	1/11000
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 700pg/μl	3,500	3,254	2,545	1,890	1,565	1,173
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 700fg/μL	3,455	2,963	2,431	1,778	1,446	1,118
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 0,7fg/μl	2,988	1,571	1,386	1,253	1,063	0,867
DNA de <i>L.(L.) infantum</i> 0,07fg/μL	0,961	0,554	0,384	0,267	0,296	0,102
Controle Negativo 1	0,374	0,066	0,067	0,094	0,085	0,049
Controle Negativo 2	0,205	0,072	0,056	0,052	0,049	0,056
Branco	0,266	0,076	0,059	0,057	0,056	0,044
Branco	0,203	0,084	0,057	0,065	0,052	0,049

G) Determinação do limite entre positividade e negatividade (*cut-off*) do ensaio de PCR-ELISA kDNA

Foram avaliadas pela reação de PCR-ELISA kDNA 25 amostras de DNA total extraídas de sangue periférico, sendo 14 casos de LV e 11 amostras provenientes de indivíduos não infectados. As leituras das absorbâncias do ensaio de PCR-ELISA kDNA realizado nestas amostras foram avaliadas pela análise da Curva ROC para determinação do valor de corte (*cut-off*) e o resultado determinado para o mesmo foi 0,096 (Tabela 6). O valor da área soacurva foi de 1,0 (IC 95%: 0,86 – 1,0).

Tabela 6. Determinação do *cut-off* através da análise dos resultados da Curva ROC

<i>Cut-off</i>	Sensibilidade %	IC 95%	Especificidade %	IC 95%
< 0,077	72,7	39,0 a 93,9	100,0	76,8 a 100,0
< 0,084	81,8	48,2 a 97,7	100,0	76,8 a 100,0
< 0,088	90,9	58,7 a 99,7	100,0	76,8 a 100,0
< 0,096	100,0	71,5 a 100,0	100,0	76,8 a 100,0
< 0,119	100,0	71,5 a 100,0	92,8	66,1 a 99,8
< 0,488	100,0	71,5 a 100,0	85,7	57,1 a 98,2
< 0,845	100,0	71,5 a 100,0	78,5	49,2 a 95,3

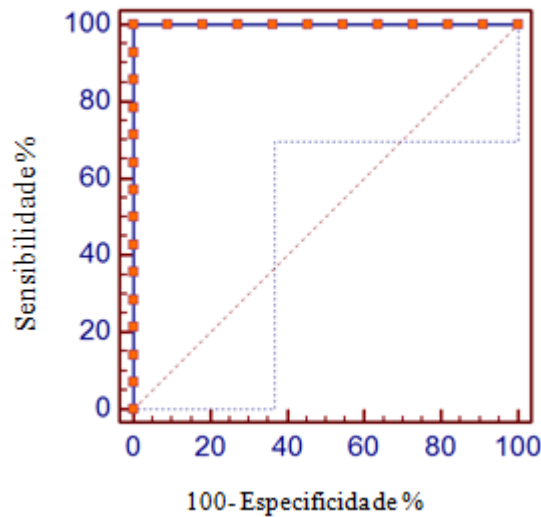


Figura 6: Curva ROC – Análise dos 14 casos de LV e 11 indivíduos não infectados para determinação do *cut-off* da reação

H) Determinação do limite de detecção do ensaio de PCR-ELISA kDNA

O limite de detecção do ensaio de PCR-ELISA kDNA foi determinado pela menor concentração de DNA genômico detectado da amostra referência de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV). Partindo da concentração de 7,02 ng/μL e da relação de absorvância 260/280nm de 1,51, o ensaio de PCR-ELISA kDNA apresentou o limite de detecção de 0,07 fg/μL (Tabela 7). O mesmo limite de detecção foi determinado pela análise por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado pelo nitrato de prata (Figura 6)

Tabela 7. Médias das leituras de absorbância (450nm) do ensaio de PCR-ELISA kDNA na avaliação do DNA extraído de cultura de *L.(L.) infantum* em diluições seriadas

DNA de <i>L.(L.) infantum</i>	PCR-ELISA kDNA 120pb	
	Resultado	Média Absorbância
700 pg/μl	Positivo	1,948
70 pg/μL	Positivo	1,719
7 pg/μl	Positivo	1,446
700f g/μl	Positivo	1,291
70 fg/μL	Positivo	0,997
7 fg/μl	Positivo	0,790
0,7 fg/μl	Positivo	0,279
0,07fg/μL	Positivo	0,194
0,007 fg/μL	Negativo	0,057
0,0007 fg/μL	Negativo	0,055
Controle Negativo 1	Negativo	0,064
Controle Negativo 2	Negativo	0,066
Branco	Negativo	0,059

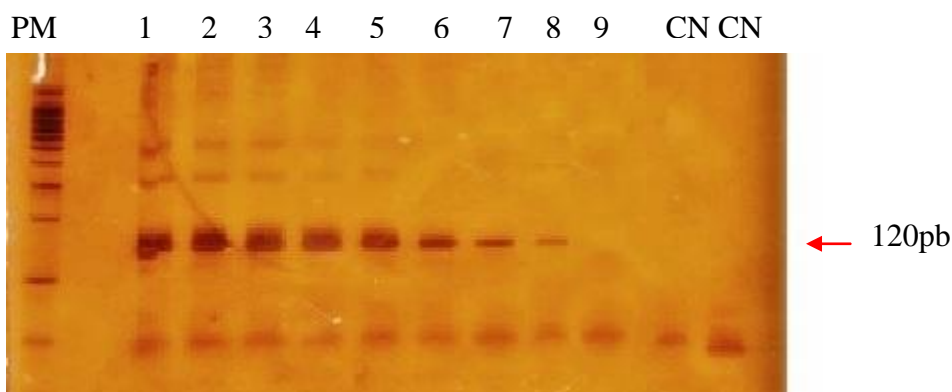


Figura 7. Gel de poli-acrilamida 6%, corado pelo nitrato de prata mostrando os produtos amplificados do DNA cultura de *L. (L.) infantum*. Canaletas: PM- Padrão de tamanho molecular ϕ X 174; 1 a 8- Diluições sucessivas do DNA cultura de *L. (L.) infantum* (1- 700pg/μL, 2-70pg/μL,3-7pg/μL, 4-700fg/μL, 5-70fg/μL, 6-7fg/μL, 7-0,7fg/μL, 8-0,07fg/μL, 9- 0,007fg/μL); CN- controle negativo

Para a determinação da capacidade de detecção do ensaio de PCR-ELISA kDNA na unidade de parasitos/mL, foram analisadas 11 amostras de sangue periférico obtidas de indivíduos não infectados e adicionadas com diferentes concentrações da amostra referência de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) (10.000, 1.000, 100, 10 e 1 parasito/ml). A capacidade de detecção do ensaio de PCR-ELISA kDNA foi de 1 parasito/mL de sangue paeriférico, conforme apresentado a Tabela 8.

Tabela 8. Médias das leituras de absorvância (450nm) das amostras de sangue periférico adicionadas de parasitos em diferentes concentrações e avaliadas no ensaio de PCR-ELISA kDNA.

Nº <i>parasitos/ml</i> sangue	PCR-ELISA kDNA	
	Resultados	Média das Absorbâncias
0	Negativo	0,053
1	Positivo	0,931
10	Positivo	1,032
100	Positivo	1,146
1000	Positivo	1,091
10000	Positivo	1,228

Todas as amostras de sangue sem adição de parasitos de *Leishmania* e com adição de parasitos apresentaram resultados negativos e positivos, respectivamente, pela avaliação por PCR e eletroforese em gel de poliacrilamida direcionada ao alvo do kDNA-120pb (Figuras 7 e 8).

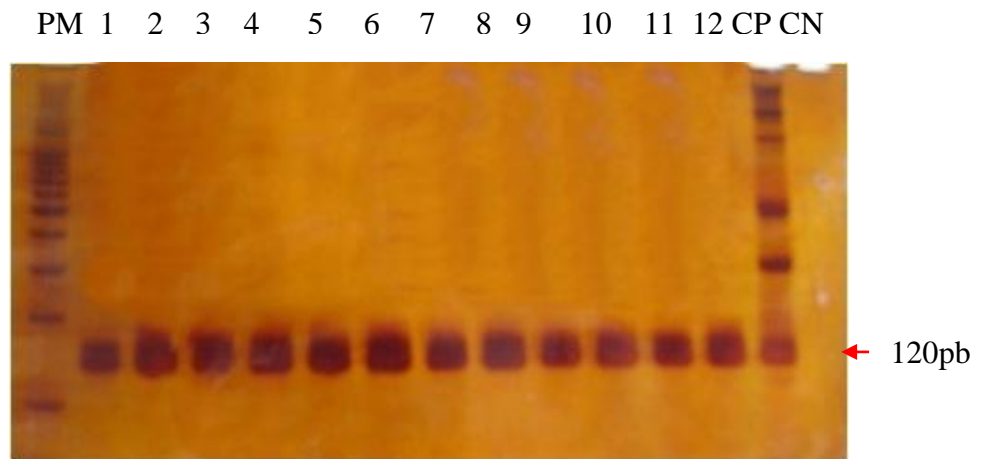


Figura 8. . Gel de poliacrilamida 6%, corado pelo nitrato de prata, apresentando produtos amplificados (120 pb) do kDNA em amostras controle negativas, contaminadas com diferentes concentrações de DNA extraído de cultivo de *L. (L.) infantum*. Canaletas: PM- Padrão de tamanho molecular ϕ X 174; 1 e 2- sangue periférico com 1 parasito/mL; 3 e 4: sangue periférico com 10 parasitos/mL; 5 e 6- sangue periférico com 100 parasitos/mL; 7 , 8 e 9 - sangue periférico com 1000 parasitos/mL; 10, 11 e 12 - sangue periférico com 10000 parasitos/mL; CN- controle negativo e CP- controle positivo.

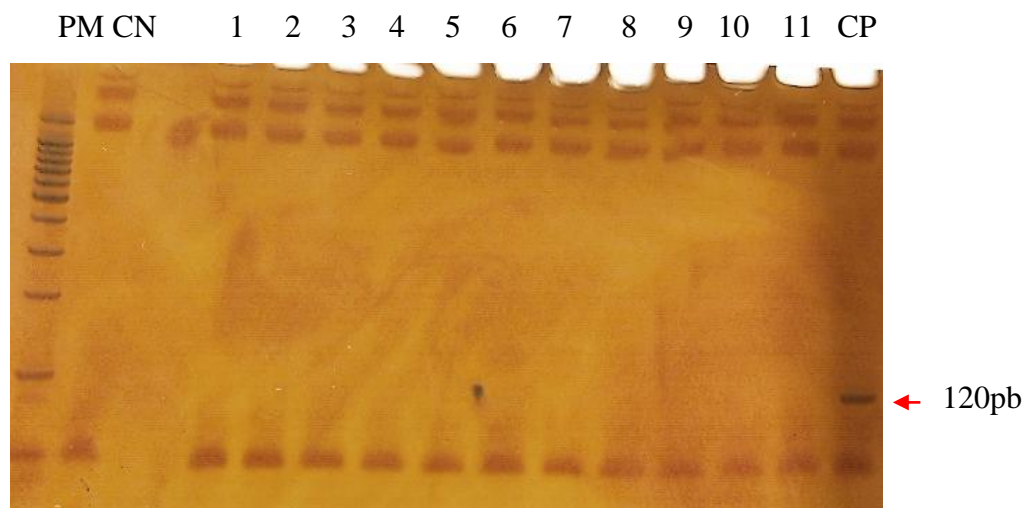


Figura 9. Gel de poliacrilamida 6%, corado pelo nitrato de prata, apresentando produtos amplificados do DNA de amostras de sangue periférico obtidas de indivíduos não infectados direcionadas ao gene do kDNA. Canaletas: PM- Padrão de tamanho molecular ϕ X 174; 1 a 11- indivíduos não infectados; CN- controle negativo e CP-Controle Positivo.

I) Determinação da especificidade analítica do ensaio PCR-ELISA kDNA.

Foi analisada a especificidade do ensaio PCR-ELISA kDNA para diferentes espécies de *Leishmania*. O método de PCR-ELISA kDNA demonstrou especificidade para as cepas referências das espécies do complexo *Donovani*: *L. (L.) infantum* e *L.(L.) donovani*. Amostras de DNA dos isolados das cepas referências das espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* não foram detectadas pelo método (Tabela 9). Esta especificidade do ensaio PCR-ELISA kDNA foi possível devido a utilização no ensaio de uma sonda específica para as espécies do complexo *Donovani*, o que não ocorre no ensaio de PCR com revelação por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%.

A análise através da busca por homologia da sonda utilizando o programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) determinou-se homologia da sonda em 53 diferentes cepas de *L. (L.) infantum* e 36 cepas de *L.(L.) donovani* e a sonda não apresentou homologia com seis cepas de *L. (V.) braziliensis*, três cepas de *L.(V.) guyanensis*, três cepas de *L.(L.) major*, uma cepa de *L. (L.) tropica*.

Tabela 9. Especificidade analítica dos métodos de PCR com avaliação por eletroforese em gel de poliacrilamida e PCR-ELISA kDNA

Amostra	Concentração DNA total (ng/μl)	Relação 260/280 nm	PCR + Eletroforese (kDNA)	PCR-ELISA kDNA	
				Resultado	Absorbância (450nm)
<i>L. (L.) infantum</i>	7,02	1,51	Positivo	Positivo	2,237
<i>L.(L.) donovani</i>	8,22	1,86	Positivo	Positivo	1,397
<i>L.(V.) braziliensis</i>	8,41	2,73	Positivo	Negativo	0,056
<i>L.(V.) guyanensis</i>	12,0	1,66	Positivo	Negativo	0,063
<i>L.(L.) amazonensis</i>	9,43	2,29	Positivo	Negativo	0,095

J) Determinação das medidas de precisão intra-ensaio (repetibilidade) e inter-ensaios (reprodutibilidade) do ensaio de PCR-ELISA kDNA

Como medidas de precisão foram determinados os coeficientes de variação (CV) intra-ensaio (repetibilidade) e inter-ensaios (reprodutibilidade).

Para a análise de repetibilidade, a curva de DNA obtido de cultura de *L. (L.) infantum* (700pg/μL, 70fg/μl, 0,7fg/μL e 0,07fg/μL) foi avaliada quatro vezes em um mesmo ensaio, bem como quatro amostras de DNA total de sangue periférico de portadores de LV e quatro amostras de DNA de indivíduos não infectados (Tabela 10). Os valores de CV para as amostras de cultura de *L. (L.) infantum* nas concentrações de 700pg/μL, 70fg/μl, 0,7fg/μL e 0,07fg/ foram respectivamente: 6,81%, 7,78%, 3,44% e 11,22%. Os valores de CV para as quatro amostras de DNA total de sangue periférico de portadores de LV foram respectivamente: 1,36%, 5,45%, 14,79%, 17,55% e os valores de CV para as quatro amostras de DNA total de sangue periférico de indivíduos não infectados foram respectivamente: 2,78%, 5,32%, 6,52% e 8,81% (Tabela 11).

Para a análise de reprodutibilidade quatro replicatas das mesmas amostras citadas acima foram avaliadas em diferentes dias. Os valores de CV para as amostras de cultura de *L. (L.) infantum* nas concentrações de 700pg/μL, 70fg/μl, 0,7fg/μL e 0,07fg/μL foram respectivamente: 5,36%, 6,03%, 9,94% e 23,13%. Os valores de CV para as quatro amostras de DNA total de sangue periférico de portadores de LV foram respectivamente: 5,44%, 8,69%, 9,31% e 12,80% e os valores de CV para as quatro amostras de DNA total de sangue periférico de indivíduos não infectados foram respectivamente: 8,24%, 15,34%, 18,68% e

21,45% (Tabela 12).

Tabela 10. Concentração de DNA e resultado de PCR-ELISA ACTB das amostras de portadores de LV e indivíduos não infectados utilizados para a avaliação das medidas de precisão intra-ensaio (repetibilidade) e inter-ensaios (reprodutibilidade) no ensaio de PCR-ELISA kDNA.

Amostra	Concentração DNA total (ng/ul)	Relação 260/280 nm	PCR-ELISA ACTB	
			Resultados	Absorbância
Portador de LV 1	14,55	1,79	Positivo	0,549
Portador de LV 2	86,82	1,79	Positivo	0,556
Portador de LV 3	41,57	1,92	Positivo	0,558
Portador de LV 4	24,14	1,80	Positivo	0,533
Indivíduo não infectado 1	24,22	1,89	Positivo	0,533
Indivíduo não infectado 2	31,68	1,89	Positivo	0,489
Indivíduo não infectado 3	29,84	1,87	Positivo	0,528
Indivíduo não infectado 4	48,42	1,83	Positivo	0,567

Tabela 11. Leituras das absorbâncias (A) das amostras de DNA de *L.(L.) infantum*, indivíduos portadores da LV e não infectados avaliadas na análise da repetibilidade do ensaio PCR-ELISA kDNA

Amostra	Ensaio de PCR-ELISA				Média das Absorbâncias	DP	CV
	A 1	A 2	A 3	A 4			
<i>L. (L.)infantum</i> (700fg/μL)	1,301	1,137	1,243	1,135	1,204	0,082	6,81
<i>L. (L.)infantum</i> (70fg/μL)	0,993	1,035	1,052	1,185	1,066	0,083	7,78
<i>L.(L.)infantum</i> (0,7fg/μL)	0,409	0,429	0,433	0,404	0,419	0,014	3,44
<i>L.(L.)infantum</i> (0,07fg/μL)	0,178	0,226	0,213	0,186	0,201	0,023	11,22
Portador de LV 1	0,399	0,409	0,400	0,409	0,404	0,005	1,36
Portador de LV 2	0,867	0,943	0,966	0,983	0,940	0,051	5,45
Portador de LV 3	0,867	1,208	1,106	0,952	1,033	0,153	14,79
Portador de LV 4	0,461	0,563	0,644	0,700	0,592	0,104	17,55
Indivíduo não infectado 1	0,097	0,092	0,097	0,093	0,095	0,003	2,78
Indivíduo não infectado 2	0,095	0,107	0,106	0,104	0,103	0,005	5,32
Indivíduo não infectado 3	0,095	0,105	0,099	0,090	0,097	0,006	6,52
Indivíduo não infectado 4	0,093	0,098	0,103	0,114	0,102	0,009	8,81

Tabela 12. Leituras das absorbâncias das amostras de DNA de *L.(L.) infantum*, indivíduos portadores da LV e não infectados avaliadas na análise da reprodutibilidade do ensaio PCR-ELISA kDNA

Amostra	Ensaio de PCR-ELISA				Média das Absorbâncias	DP	CV
	A Ensaio 1	A Ensaio 2	A Ensaio 3	A Ensaio 4			
<i>L. (L.)infantum</i> (700fg/μL)	1,772	1,981	1,791	1,793	1,834	0,098	5,36
<i>L. (L.)infantum</i> (70fg/μL)	1,677	1,843	1,678	1,600	1,700	0,102	6,03
<i>L.(L.)infantum</i> (0,7fg/μL)	0,854	1,001	0,985	0,821	0,915	0,091	9,94
<i>L.(L.)infantum</i> (0,07fg/μL)	0,325	0,349	0,244	0,434	0,338	0,078	23,13
Portador de LV 1	1,729	1,585	1,653	1,524	1,623	0,088	5,44
Portador de LV 2	1,122	1,240	1,113	1,002	1,119	0,097	8,69
Portador de LV 3	1,726	1,830	1,779	1,473	1,702	0,158	9,31
Portador de LV 4	0,870	0,887	0,968	0,706	0,858	0,110	12,80
Indivíduo não infectado 1	0,075	0,081	0,077	0,090	0,081	0,007	8,24
Indivíduo não infectado 2	0,066	0,068	0,091	0,081	0,077	0,012	15,34
Indivíduo não infectado 3	0,067	0,065	0,088	0,094	0,079	0,015	18,68
Indivíduo não infectado 4	0,064	0,067	0,068	0,098	0,074	0,016	21,45

K) Análise da concordância entre o ensaio de PCR-ELISA kDNA e o PCR com revelação por eletroforese em gel de poliacrilamila 6%.

Na análise das 25 amostras dos indivíduos casos de LV e não infectados, o índice Kappa mostrou concordância classificada como “substancial” (1,0) entre o ensaio de PCR-ELISA kDNA e o PCR com revelação por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. Ambas as reações foram direcionadas para o mesmo gene do kDNA (Tabela 13).

Tabela 13. Análise da concordância entre o ensaio de PCR-ELISA kDNA e o PCR com revelação por eletroforese em gel de poliacrilamila 6% na avaliação do DNA extraído de amostras de sangue periférico de 25 amostras de indivíduos casos de LV e não infectados

PCR-ELISA	PCR+ eletroforese	
	Positivo	Negativo
Positivo	14	00
Negativo	00	11
TOTAL	14	11

Kappa: 1,0

5.1.2 Desenvolvimento do ensaio de ELISA ACTB humano

A) Ensaio de ELISA ACTB humano

Após a padronização do ensaio de PCR-ELISA para kDNA, o mesmo protocolo foi avaliado para o gene ACTB humano. Foram testadas quatro amostras de DNA total extraídas de sangue periférico de indivíduos não infectados para LV (Tabela 14).

Tabela 14. Leituras das absorbâncias apresentadas pelas amostras de DNA total extraídas de sangue periférico de indivíduos sadios na padronização do ensaio de PCR-ELISA ACTB humano

Amostra	Concentração DNA total (ng/ μ l)	Relação 260/280 nm
Indivíduo não infectado 1	7,16	1,98
Indivíduo não infectado 2	9,76	1,93
Indivíduo não infectado 3	10,90	1,96
Indivíduo não infectado 4	11,75	1,92

B) Diluição do DNA amplificado das amostras e controles na microplaca MaxiSorp[®] (ThermoScientific Nunc) no ensaio de PCR-ELISA ACTB humano

O ensaio de PCR-ELISA ACTB humano foi avaliado com o DNA amplificado das amostras na microplaca MaxiSorp[®] (ThermoScientific Nunc) nas diluições de 5:95 e 10:90, para o volume final de 100 μ L. A diluição de 10:90 apresentou maior diferença entre as leituras de absorbância do ensaio de PCR-ELISA ACTB humano na avaliação das amostras positivas e controles negativos quando comparada com a diluição 5:95 (Tabela 15).

Tabela 15. Leituras das absorvâncias (450nm) do ensaio de PCR-ELISA ACTB humano de acordo com o uso das diferentes diluições do DNA das amostras na microplaca MaxiSorp® (ThermoScientific Nunc).

Amostras	Diluição da amostra	
	5:95	10:90
Indivíduo não infectado 1	0,447	0,647
Indivíduo não infectado 2	0,474	0,704
Indivíduo não infectado 3	0,474	0,719
Indivíduo não infectado 4	0,534	0,734
Controle Negativo 1	0,075	0,076
Controle Negativo 2	0,066	0,062
Branco	0,036	0,035
Branco	0,039	0,042

C) Titulação do anticorpo IgG de coelho anti-fluoresceína Oregon Green® conjugado a peroxidase (Invitrogen, Califórnia, EUA)

Foi determinado o título utilizado no ensaio PCR-ELISA ACTB humano pela diluição sucessiva do anticorpo nas diluições: 1/1000, 1/1500 e 1/2000. O título escolhido foi de 1/1000, pois apresentou maiores diferenças entre as leituras de densidades óticas das amostras e dos controles negativos (Tabela 16 e Figura 9).

Tabela 16. Leituras das absorvâncias (450nm) das diferentes concentrações do anticorpo IgG anti-fluoresceína Oregon Green® conjugado a peroxidase (Invitrogen, Califórnia, EUA) avaliadas no ensaio PCR-ELISA ACTB humano

Amostras	Concentração do anticorpo		
	1/1000	1/1500	1/2000
Indivíduo não infectado 1	0,396	0,343	0,297
Indivíduo não infectado 2	0,465	0,366	0,303
Indivíduo não infectado 3	0,480	0,388	0,310
Controle Negativo	0,056	0,051	0,048
Branco	0,044	0,049	0,048

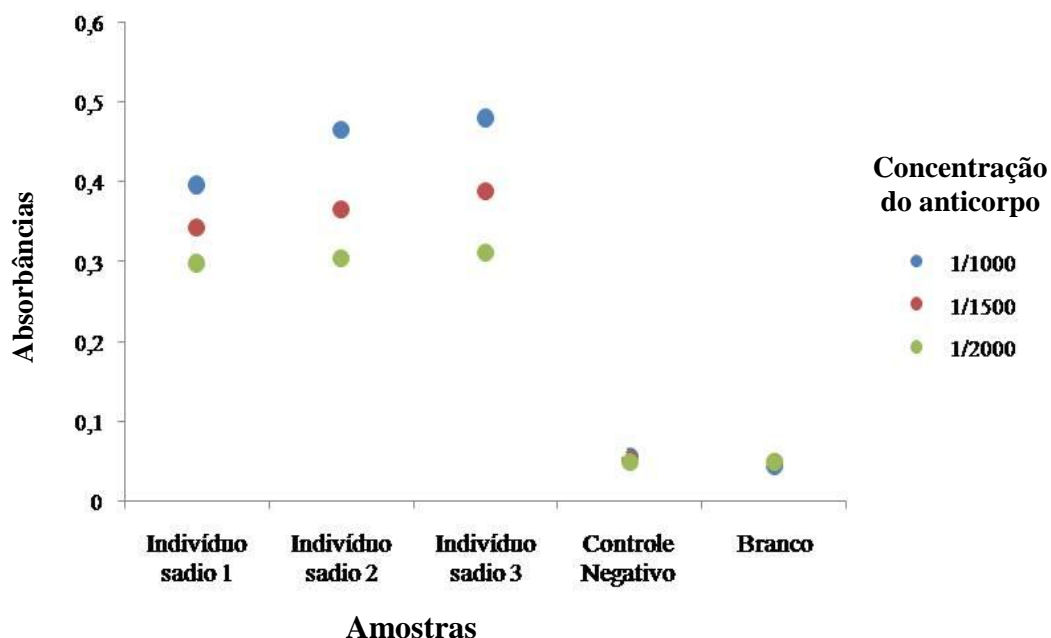


Figura 10. Comparação das leituras de absorbância com diferentes títulos do anticorpo IgG de coelho anti-fluoresceína Oregon Green® conjugado a peroxidase (Invitrogen, Califórnia, EUA) avaliados no ensaio de PCR-ELISA ACTB humano. CN: controle negativo, Br: branco.

D) Determinação do limite entre positividade e negatividade (*cut-off*) para o ensaio de PCR-ELISA ACTB humano

A determinação da leitura da absorbância a partir da qual as amostras foram consideradas positivas ou o valor de corte (*cut-off*) foi realizada pela análise da média das leituras das absorbâncias das amostras de controles negativos (mix da PCR sem DNA e controle negativo do processo de extração de DNA de sangue periférico humano) acrescidas de três desvios padrão.

O *cut-off* determinado para a reação de PCR-ELISA ACTB humano após a padronização foi de 0,099.

E) Avaliação das amostras utilizadas na padronização do ensaio de PCR-ELISA kDNA pelo ensaio de PCR-ELISA ACTB humano

As amostras de sangue periférico obtidas de indivíduos não infectados adicionadas com diferentes concentrações da amostra referência de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) (10.000, 1.000, 100, 10 e 1 parasito/ml) foram avaliadas pelo ensaio de PCR-ELISA ACTB humano (Tabela 17).

Tabela 17. Avaliação das amostras de sangue periférico obtidas de indivíduos não infectados adicionadas com diferentes concentrações da amostra referência de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) (10.000, 1.000, 100, 10 e 1 parasito/ml) pelo ensaio de PCR-ELISA ACTB humano

Nº parasito/ml sangue	PCR-ELISA ACTB humano	
	Resultados	Média das Absorbâncias (450nm)
1	Positivo	0,298
10	Positivo	0,232
100	Positivo	0,239
1000	Positivo	0,204
10000	Positivo	0,184

Todas as 25 amostras de DNA total extraídas de sangue periférico de casos de LV e de indivíduos não infectados incluídas no estudo foram também avaliadas pelo ensaio de PCR-ELISA ACTB humano, como medida controle para o processo de extração de DNA total e amplificação por PCR, e foi possível obter resultados positivos em todas as avaliações (Tabela 18).

Tabela 18. Médias das leituras das absorbâncias das amostras de DNA total extraídas de sangue periférico de casos de LV e de indivíduos não infectados avaliadas pelo ensaio de PCR-ELISA ACTB humano

Amostras	PCR-ELISA ACTB humano	
	Resultados	Média das Absorbâncias
Portadores da LVH	Positivo	0,585
Indivíduos não-infectados	Positivo	0,607

Todas as amostras de DNA total extraídas de sangue periférico de indivíduos incluídos no estudo foram também analisadas por PCR com revelação por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata e direcionado ao gene da ACTB humano e apresentaram resultados positivos.

5.2 Parte II- Determinação do desempenho do ensaio de PCR-ELISA kDNA no diagnóstico de diferentes grupos clínicos de LV

5.2.1 Avaliação do potencial diagnóstico e do desempenho do ensaio PCR-ELISA kDNA

O potencial diagnóstico do ensaio de PCR-ELISA kDNA foi avaliado em diferentes grupos de indivíduos portadores da LV (crianças e adultos), portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV e moradores de área endêmica (indivíduos assintomáticos e não infectados). Para a determinação da leitura da absorbância a partir da qual as amostras foram consideradas positivas ou o valor de corte (*cut-off*) foi utilizado o valor de 0,096, encontrado na etapa de padronização do ensaio com 14 amostras positivas e 11 amostras negativas (Tabela 19 e 20).

Tabela 19. Avaliação do potencial diagnóstico do ensaio de PCR-ELISA kDNA no diagnóstico da infecção por *L.(L.) infantum* nos grupos de indivíduos portadores da LV e da co-infecção *Leishmania*/HIV

Grupos	Indivíduos positivos no ensaio de PCR-ELISA kDNA		Total
	Nº	%	
Portadores da LV	105	100	105
Portadores da co-infecção <i>Leishmania</i> /HIV	25	100	25

Tabela 20. Avaliação do potencial diagnóstico do ensaio de PCR-ELISA kDNA no diagnóstico da infecção por *L.(L.) infantum* nos grupos de indivíduos moradores de área endêmica

Grupos	Indivíduos positivos no ensaio de PCR-ELISA kDNA		Total
	Nº	%	
Assintomáticos	33	100	33
Não-infectados	02	5	40

O ensaio de PCR-ELISA kDNA demonstrou a capacidade de detecção da infecção por *L. (L.) infantum* em 100% dos portadores de LV (100% das crianças e adultos) e 100% dos portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV (Tabela 19). Para os indivíduos moradores de área endêmica, o ensaio foi capaz de detectar a infecção por *L. (L.) infantum* em 100% dos

indivíduos assintomáticos e somente 5% dos indivíduos não infectados obtiveram resultados positivos (Tabela 20).

Os valores de sensibilidade e especificidade foram calculados através do resultado obtido pela análise das leituras de absorvância do ensaio PCR-ELISA kDNA nas amostras de pacientes doentes (indivíduos portadores de LV e portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV) e indivíduos não infectados moradores de área endêmica (Tabela 21).

Tabela 21. Avaliação do ensaio de PCR-ELISA kDNA no diagnóstico da leishmaniose visceral em 130 pacientes doentes (indivíduos portadores de LV e portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV) e 40 indivíduos não infectados moradores de área endêmica.

PCR-ELISA	Doença	
	Positivo	Negativo
Positivo	130	02
Negativo	00	38
TOTAL	130	40

De acordo com a análise da Tabela 21, o ensaio de PCR-ELISA kDNA apresentou 100% de sensibilidade (IC 95%: 97,1 a 100%) e 95% de especificidade (IC 95%: 83,5 a 98,6%).

5.2.2 Ensaio de PCR-ELISA ACTB humano

Todas as amostras de indivíduos portadores de LV, portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV e moradores de área endêmica (assintomáticos e não infectados) foram avaliadas pelo ensaio de PCR-ELISA para detecção do gene ACTB humano como controle do processo de extração de DNA e amplificação por PCR, e apresentaram resultados positivos em todas as avaliações (Tabela 22).

Para a determinação da leitura da absorvância a partir da qual as amostras foram consideradas positivas ou o valor de corte (*cut-off*) foi utilizado o valor de 0,099, encontrado na etapa de padronização do ensaio.

Tabela 22. Médias das leituras de absorvância das amostras de DNA de sangue periférico de indivíduos portadores de LV, portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV e moradores de área endêmica (assintomáticos e não infectados) avaliadas no ensaio de PCR-ELISA ACTB humano

Grupos	PCR-ELISA ACTB	
	Resultados	Média das Absorbâncias
Portadores da LV	Positivo	0,474
Portadores da co-infecção <i>Leishmania</i> /HIV	Positivo	0,438
Moradores de área endêmica	Positivo	0,601

5.2.3 Classificação dos indivíduos (negativos, positivos e indeterminados) de acordo com a leitura de absorvância no ensaio de PCR-ELISA kDNA

Após a avaliação dos diferentes grupos clínicos de LV no ensaio de PCR-ELISA kDNA foi identificada uma possível zona de indeterminação capaz de diferenciar os indivíduos com infecção assintomática e com doença.

O valor de leitura da absorvância (A) a partir da qual as amostras são consideradas negativas (*cut-off* de 0,096) foi determinado na padronização do ensaio com 14 amostras de casos de LV e de 11 indivíduos não infectados.

A determinação da leitura da absorvância (A) a partir da qual as amostras são consideradas positivas ou indeterminadas foi realizada pela análise da Curva ROC das leituras das densidades óticas do ensaio de PCR-ELISA kDNA na avaliação das amostras dos 130 indivíduos doentes (portadores da LV e da co-infecção *Leishmania*/HIV) e de 33 indivíduos assintomáticos. O ponto de corte (*cut-off*) foi determinado em 0,709. O valor da área sobre a curva foi de 0,91 e o IC 95%: 0,87 – 0,96 (Figura 11).

Assim, os indivíduos foram classificados como negativos, portadores de infecção assintomática ou ativa (Tabela 23 e Figura 10):

- Leitura de absorvância < 0,096: negativo;
- Leitura de absorvância 0,096 a 0,709: compatível com infecção por *L.(L.) infantum*
- Leitura de absorvância \geq 0,709: compatível com leishmaniose visceral ativa.

Tabela 23. Número de indivíduos com a classificação clínica de acordo com o ensaio de PCR-ELISA kDNA e os grupos de pacientes do estudo

Grupos (número de pacientes)	Nº de indivíduos com a classificação clínica		
	Negativos (%)	Indeterminados (%)	Positivos (%)
Não Infectados (40)	38 (95,0)	2 (5,0)	0
Assintomáticos (33)	0	29 (87,8)	4 (12,2)
Doentes (130)	0	16 (12,3)	114 (87,7)

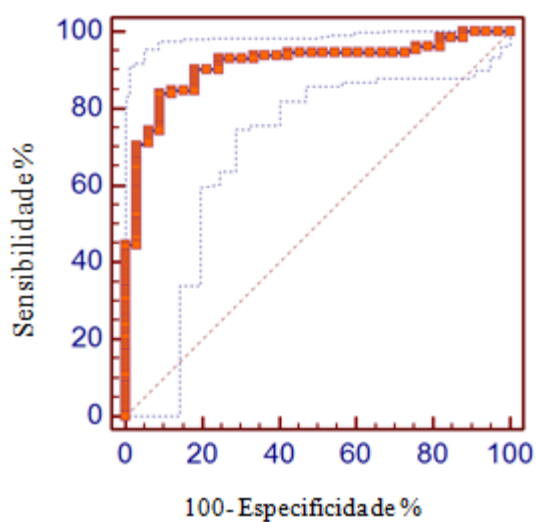


Figura 11. Curva ROC das amostras de indivíduos portadores da LV ativa e assintomáticos.

Embora o avanço tecnológico ocorrido no século XX tenha resultado em uma variedade de técnicas laboratoriais que significaram importante contribuição ao diagnóstico de doenças em geral e das infecciosas em particular, o diagnóstico da LV avançou pouco nas últimas décadas, provavelmente por duas razões principais: por se tratar de doença negligenciada, que prevê pequeno retorno comercial ao investimento em pesquisa e desenvolvimento e pela complexidade biológica própria da infecção (Assis et al., 2008; Melo, 2010).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle das Leishmanioses, coordenado pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, recomenda que o diagnóstico da LV seja realizado por métodos sorológicos, parasitológicos e moleculares (Ministério da Saúde-Brasil, 2006).

Os métodos moleculares são ferramentas importantes em programas de controle da LV, uma vez que são úteis na detecção de casos com baixa intensidade de infecção, para os quais os exames parasitológicos, que são procedimentos invasivos apresentam sensibilidade limitada. Além disso, diminuem a probabilidade de reações cruzadas em vigência de outras doenças e permitem a distinção entre infecção ativa, sub-clínica ou passada o que não é possível com os métodos sorológicos (Badaró et al, 1986a; Gontijo e Melo, 2004; Cupolillo, 2005; Ministério da Saúde-Brasil, 2006; Alam et al., 2009).

O presente estudo propôs o desenvolvimento e a padronização de um ensaio de PCR-ELISA para o diagnóstico da LV em amostras de sangue periférico. A escolha pela metodologia de PCR-ELISA ocorreu devido à característica da técnica de favorecer a análise simultânea de um grande número de amostras com elevada especificidade e sensibilidade (Martín Sanchez et al., 2002; Doncker et al., 2005; Gomes et al., 2010). O material biológico escolhido para a avaliação do ensaio foram amostras de sangue periférico, pois são obtidas de forma menos invasiva e estudos com diferentes ensaios de PCR que utilizaram este material biológico para o diagnóstico da LV apresentaram sensibilidade variando de 91 a 100% e especificidade entre 87 a 100% (Wu et al., 1997; Disch et al., 2003; Maurya et al., 2005; Cupolillo, 2005).

O ensaio de PCR-ELISA, padronizado neste estudo, utilizou um dos principais alvos de DNA de *Leishmania* usado nas técnicas moleculares desenvolvidas até o momento, que é o DNA do cinetoplasto ou kDNA (Rodgers et al., 1990; Pirmez et al., 1999; Romero et al., 2001). A utilização desse alvo favorece uma elevada sensibilidade do ensaio, uma vez que o fragmento

de DNA amplificado pertence à região do minicírculo do cinetoplasto de *Leishmania* que possui de a 10.000 a 20.000 cópias de seqüências na célula de *Leishmania* (Rodgers et al., 1990; Degrave, 1994). No entanto, a utilização deste alvo molecular não permite a quantificação precisa do DNA de *Leishmania* devido à grande variabilidade do número de cópias do kDNA em diferentes cepas, assim optou-se pelo desenvolvimento de um ensaio do tipo semi-quantitativo.

A região do kDNA amplificada no ensaio corresponde a um fragmento de 120 pares de bases e é uma região bastante conservada para o gênero *Leishmania* (Degrave, 1994; Volpini et al., 2004). A especificidade do ensaio para os agentes causadores da LV só foi possível devido à utilização de uma sonda desenhada de forma a complementar uma seqüência específica para o complexo *Donovani*. Na avaliação do ensaio de PCR-ELISA proposto, somente as espécies *L.(L.) infantum* e *L.(L.) donovani* apresentaram densidades óticas que possibilitaram diferenciação dos controles negativos e brancos na reação de ELISA. A mesma técnica foi utilizada por Martín-Sanchez et al. (2001) no qual o ensaio de PCR-ELISA desenvolvido foi específico para a espécie *L. (L.) infantum*. Esse fato pode ser de grande importância para aplicação do ensaio em inquéritos epidemiológicos e ações de vigilância, principalmente em áreas emergentes, onde a diferenciação das espécies favorece as medidas de controle da doença (Cupolillo, 2005; Pereira-Chioccola, 2009). A determinação das espécies causadoras LV pode ser de grande importância para determinação do prognóstico, definição terapêutica e análises epidemiológicas. A aplicação do ensaio em inquéritos epidemiológicos e ações de vigilância, principalmente em áreas emergentes, favorecem as medidas de controle da doença (Paiva et al., 2004; Cupolillo, 2005; Pereira-Chioccola, 2009, Salotra et al., 2001 e Schallig e Oskam, 2002).

O princípio da técnica de PCR-ELISA baseou-se na captura do produto amplificado e marcado com biotina na extremidade 5' à placa de poliestireno recoberta com estreptavidina, seguida da hibridização da sonda marcada com fluoresceína na extremidade 5' e revelação do produto com um conjugado enzimático (Vesanen et al., 1996). Uma nova proposta seria a utilização de iniciadores anti-senso marcado em sua região 5' com digoxigenina o que dispensaria o uso da sonda (Kobets et al, 2010). Porém, esta metodologia favorece o surgimento de resultados falso-positivos, devido à probabilidade de detecção de dímeros de iniciadores.

O desenvolvimento do ensaio de PCR-ELISA kDNA foi realizado com a utilização de diferentes diluições do DNA genômico de *L.(L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) a partir do método de Lüneberg et al 1993 e Gomes et al 2010. Após os testes para avaliação dos diferentes reagentes e suas concentrações, o ensaio de PCR-ELISA kDNA foi padronizado com 5µg/mL de estreptavidina na sensibilização da microplaca, diluição do DNA amplificado na proporção de 4:96, 0,2pMol de sonda e uso do anticorpo anti-fluoresceína Oregon Green® conjugado a peroxidase (Invitrogen). A escolha destes reagentes e concentrações seguiu critérios de apresentação de melhores valores de diferenciação das absorvâncias entre amostras positivas e negativas e maior rendimento dos reagentes (Gregori, 1999; Gregori et al., 2000; Dantas, 2004; Minozzo et al., 2004; Teles et al., 2012).

A solução de hibridização escolhida para a padronização do ensaio foi a solução de Formamida (SSPE5X 70%, Formamida 30%, 0,1% SDS). Esta solução apresentou valores de absorvância dos controles negativos menores do que quando se utilizou a solução de hibridização de Ficoll (0,6M NaCl; 20mM fosfato de sódio pH 7.4; 1mM EDTA; 0,02% Ficoll; 0,02% polyvinylpyrrolidone; 0,02% BSA), o que diminui a possibilidade de resultados falso-positivos (Gregori, 2000; Dantas, 2004). Além disso, com esta solução a temperatura de incubação para a hibridização da sonda é de 37°C, o que otimiza o uso de equipamentos das séries de ELISA presentes em laboratórios clínicos (Matthiesen & Hansen, 2012).

O título do anticorpo anti-fluoresceína conjugado à peroxidase escolhido para o ensaio de PCR-ELISA kDNA foi de 1/9000. Este título foi determinado após verificar que o ensaio de ELISA apresentou o mesmo valor de limite de detecção apresentado pela avaliação da reação de PCR kDNA seguida de revelação por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata. Ainda, com este título foi possível a melhor diferenciação das leituras de absorvância entre amostras positivas e negativas (Gregori, 1999; Gregori et al., 2000; Dantas, 2004; Minozzo et al., 2004; Teles et al., 2012).

Após o desenvolvimento e padronização do ensaio de PCR-ELISA kDNA foi determinado o limite de detecção de 0,07fg/µL de DNA genômico de *L. infantum* e em outra escala, de 1 parasito/mL de sangue periférico. Este valor de limite de detecção apresentado pelo ensaio foi superior ao apresentado por outros ensaios de PCR-ELISA para LV e descritos na literatura: 10 pg/µL e 1,0fg/µL no estudo de Martín- Sánchez et al., (2001); 5fg/µL no kit que gerou patente por Martín-Sánchez & Francisco em 2003 e 0,3fg/µL no estudo de Kobets et al., (2010). A capacidade de detecção do ensaio padronizado só foi testada até 1,0 parasito/mL de

sangue periférico, outros ensaios de PCR-ELISA avaliaram diluições sucessivas do DNA de cultura e foram capazes de detectar de 0,1 a 1,0 parasito/mL de sangue periférico (Martín-Sánchez et al., 2002); 0,01 parasito/mL de sangue periférico (Martín-Sánchez & Francisco, 2003); 1,0 parasito/180 μ L de sangue periférico (Doncker et al., 2005) e 0,004 parasitos/mL de sangue periférico (Kobets et al., 2010). A detecção de 1,0 parasito/mL é considerada altamente satisfatória para amostras de sangue (Spanakos et al., 2002).

A estimativa de custo unitário da PCR-ELISA é de R\$11,75, sendo R\$ 6,00 o processo de extração do DNA, R\$ 1,00 a reação de PCR e R\$ 4,75 a reação de ELISA. Este valor foi estimado a partir dos custos e rendimento dos reagentes utilizados na reação do presente estudo. Este valor é próximo do valor unitário do ensaio de PCR em tempo real: R\$11,15, sendo R\$6,00 extração do DNA, R\$ 5,15 do Kit de PCR em tempo real. Para o cálculo, foi utilizado valor do kit de PCR em tempo real referência JumpStart™ Taq Ready Mix for High Throughput Quantitative PCR - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA (preço informado em no site oficial do fabricante em 15/03/2013).

Para a determinação do limite entre positividade e negatividade (*cut-off*) no ensaio de PCR-ELISA kDNA, foi utilizado um painel de amostras de sangue periférico do Laboratório de Pesquisas Clínicas do CPqRR. As amostras consideradas casos de LV foram criteriosamente selecionadas, além de clínica sugestiva para a doença, possuíam diagnóstico parasitológico positivo. Os exames parasitológicos são considerados como diagnóstico padrão para LV (Ministério da Saúde-Brasil, 2006). As amostras negativas são de indivíduos saudáveis não infectados de área endêmica. Para a construção da Curva ROC é essencial que o pesquisador estabeleça um padrão-ouro que descreva o estado do indivíduo com maior veracidade possível (Martinez et al., 2003), pois nessa fase de desenvolvimento do teste, a caracterização das amostras se torna mais importante do que estabelecer intervalos de confiança estreitos de sensibilidade e especificidade (FIND, 2012).

A maioria dos ensaios de PCR-ELISA desenvolvidos (Costa et al.,1996; Martín-Sánchez et al., 2001; Alborzi et al., 2008) utilizaram reagentes ou kits comerciais para a detecção do produto amplificado como DIG Detection kit (Boehringer, Mannheim, Germany) ou Dig-Labeling kit (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). No momento, não existe nenhum teste comercial para PCR-ELISA disponível no mercado.

A precisão do ensaio de PCR-ELISA kDNA pode ser considerada boa, uma vez que o ensaio apresentou variação intra-ensaio de 1,4 a 17,5% e inter-ensaio de 5,4 a 23,1%. Ainda não existe descrito em literatura um coeficiente de variação máximo aceitável para os testes moleculares para. Sendo assim, as percentagens do presente ensaio são próximas ou inferiores às de outros ensaios baseados no PCR-ELISA descritos na literatura e que apresentaram coeficientes de variação intra-ensaio variando de 1,9 a 12,0 e inter-ensaio de 3,0 a 27,0% (Morata et al., 2003; Queipo-Ortño et al., 2004; Musiani et al., 2007; Gomes et al., 2010).

Após o desenvolvimento e a padronização do ensaio de PCR-ELISA kDNA, o mesmo protocolo foi utilizado para desenvolver um ensaio de PCR-ELISA direcionado para o gene *ACTB* humano. Este ensaio foi desenvolvido a fim de se estabelecer um controle do processo de extração de DNA total e amplificação por PCR para as amostras de sangue periférico que apresentassem resultados negativos no ensaio de PCR-ELISA kDNA. O gene *ACTB* humano foi escolhido por ser um gene do citoesqueleto da membrana celular e bastante conservado (Gomes et al., 2010 e Musso et al., 1996). O ensaio foi padronizado com a concentração de diluição do DNA do gene *ACTB* amplificado na proporção de 10:90 em um volume final de 100µL e com o título do anticorpo IgG de coelho anti-fluoresceína Oregon Green® conjugado a peroxidase (Invitrogen, Califórnia, EUA) na proporção de 1:1000. Novamente, as concentrações dos reagentes utilizados foram padronizadas a fim de obter melhores valores de diferenciação das absorbâncias entre as amostras positivas e negativas e maior rendimento dos reagentes (Gregori, 1999; Gregori et al., 2000; Dantas, 2004; Minozzo et al., 2004; Teles et al., 2012).

Todas as amostras analisadas na padronização e avaliação do ensaio PCR-ELISA kDNA proposto neste estudo foram avaliadas no ensaio de PCR-ELISA para o gene humano *ACTB*. Nenhum outro ensaio de PCR-ELISA desenvolvido para o diagnóstico da leishmaniose visceral apresentou esta ferramenta de controle do processo de extração de DNA e amplificação por PCR das amostras clínicas analisadas (Costa et al., 1996; Martín Sánchez et al., 2001; Martín Sánchez et al., 2002; Doncker et al., 2005; Alborzi et al., 2008).

O ensaio de PCR-ELISA kDNA foi validado com 203 amostras de sangue periférico, pertencentes a 105 pacientes portadores da LV, 25 pacientes apresentando a co-infecção *Leishmania*/HIV e 73 moradores de área endêmica (33 indivíduos classificados como portadores de infecção assintomática e 40 indivíduos não infectados). Na análise de validação,

o ensaio apresentou bom desempenho, com valores de sensibilidade de 100,0% (IC 95%: 97,1 a 100%) e especificidade de 95% (IC 95%: 83,5 a 98,6%).

O valor de sensibilidade apresentado pelo ensaio de PCR-ELISA kDNA é bastante satisfatório, tendo em vista que os valores de sensibilidade apresentados pelos exames parasitológicos diretos para LV, variam de 95 a 98% para o aspirado de baço (Chulay & Bryceson, 1983; Zijlstra et al., 1992; OMS, 2010), 76 a 91% para o aspirado de fígado, 52 a 89% para o aspirado de medula óssea e 52 a 69% para o aspirado de linfonodos (Zijlstra et al., 1992; Ho et al., 1948; Zijlstra et al., 1992; Babiker et al., 2007).

Comparando os valores de sensibilidade e especificidade do ensaio de PCR-ELISA kDNA proposto com os exames sorológicos para LV observa-se também o bom desempenho do teste, uma vez que os testes sorológicos apresentam índices de desempenho variados. Para o DAT, as taxas de sensibilidade variam de 94,4 a 100% e as de especificidade de 97,7 a 100% (Oliveira et al., 2011). A RIFI tem apresentado taxas de sensibilidade que variam de 82 a 95% e de especificidade variando de 78 a 92% (Sengupta, 1969; Cahil, 1970; Assis et al., 2008, Maia et al., 2012). Os testes imunocromatográficos tem apresentado taxas de sensibilidade entre 67 a 100% e especificidade na faixa de 59 a 100% (Sundar et al., 1998; Zijlstra, 2001; Carvalho et al., 2003; Ritmeijer et al., 2006; Assis et al., 2008). Já os ensaios de ELISA, dependendo do antígeno utilizado (bruto ou recombinante), tem apresentado taxas de sensibilidade que variam de 80 a 100% e de especificidade que variam de 71 a 100% (Braz et al., 2002; Sundar & Raí, 2002; Maalej et al., 2003; Kurkjian et al., 2005; Assis et al., 2008; Pedras et al., 2008).

Os valores de sensibilidade e especificidade do ensaio de PCR-ELISA kDNA são próximos ou superiores quando comparados com valores apresentados por outros ensaios de PCR padronizados para o diagnóstico da LV e descritos na literatura. Para estes ensaios os valores de sensibilidade variam de 91 a 100% e de especificidade variam de 87 a 100% (Wu et al., 1997; Disch et al., 2003; Maurya et al., 2005).

A sensibilidade, do ensaio de PCR-ELISA kDNA proposto, foi próxima a aquela apresentada (98%) apresentado pelo ensaio de PCR-ELISA para diagnóstico da LV e desenvolvido por Costa et al. (1996). Neste mesmo estudo foram utilizadas amostras de sangue periférico e amostras de aspirado de medula. Apesar da alta sensibilidade da PCR em amostras de aspirado de medula óssea, o uso deste tipo de amostra clínica não é indicado, pois, uma das

grandes vantagens de realizar o diagnóstico laboratorial da LV empregando métodos moleculares, que são técnicas bastante sensíveis, é o fato de não ser necessário utilizar métodos invasivos para obtenção de amostra clínica, como o aspirado de medula óssea, punção de baço, aspirado de linfonodo, biópsia de fígado ou mesmo o uso de grande volume de sangue (Cupolillo, 2005).

Em 2003, a Universidade de Granada (Granada, Espanha), registrou a patente na Espanha de um ensaio de PCR-ELISA -para o alvo do cinetoplasto de *Leishmania*- para o diagnóstico de *L.(L.) infantum*, desenvolvido por Martín Sánchez e Morillas Márquez. O ensaio foi testado em somente oito amostras humanas e 70 amostras caninas, todas casos de LV. Todas as amostras avaliadas foram positivas no ensaio e todos os indivíduos sadios apresentaram resultados negativos. O ensaio apresentou melhores valores de sensibilidade quando comparado com outras técnicas sorológicas e parasitológicas avaliadas nas mesmas amostras (Martín-Sánchez & Francisco, 2003).

Em 2005, foi desenvolvido um ensaio de PCR-ELISA para o diagnóstico da LV utilizando o alvo rSSU de *Leishmania* com valores de sensibilidade de 83,9% e especificidade de 100% e 87,2%, quando foram avaliadas amostras de indivíduos controles saudáveis que nunca viajaram para área endêmica e controles de áreas endêmicas para LV, respectivamente (Doncker et al., 2005). Este último valor de especificidade encontrado foi menor do que o apresentado pelo ensaio proposto no presente estudo (95%), pois todos os indivíduos não infectados analisados no ensaio de PCR-ELISA kDNA eram moradores de área endêmica.

Os demais ensaios de PCR-ELISA desenvolvidos para o diagnóstico da LV e descritos na literatura não foram avaliados com base nos índices de desempenho de sensibilidade e especificidade (Martín Sánchez et al., 2001; Alborzi et al., 2008; Kobets et al., 2010).

O ensaio de PCR-ELISA kDNA foi validado neste estudo em diferentes grupos clínicos e indivíduos de diferentes faixas etárias a fim de assegurar um amplo uso do método para o diagnóstico da LV humana. A LV atinge indivíduos de diferentes faixas etárias e sintomatologias. Em 2010, 46% dos indivíduos notificados com LV no Brasil eram menores de 9 anos, 10,5% com idade de 10 a 19 anos, 37% de 20 a 59 anos e 6,5% com idade superior a 60 anos (Ministério da Saúde-Brasil, 2012). Estudos de incidência de 2007 a 2008 apontam que 3,7% dos casos de LV eram de indivíduos apresentando a co-infecção *Leishmania*/HIV, sendo que destes, 77,7% eram de indivíduos adultos (Sousa-Gomes et al., 2011).

A sensibilidade do ensaio de PCR-ELISA kDNA no sangue periférico para crianças foi tão elevada quanto a relatada na literatura para a PCR convencional com uso de aspirado de medula óssea (91,1%), método este classificado entre os mais sensíveis (Fraga et al., 2010). Outros investigadores confirmaram esses resultados, relatando a mesma eficácia para o diagnóstico de LV por meio de técnicas de PCR quando se faz uso tanto de aspirado de medula óssea ou de sangue periférico. Deborggraeve et al. (2008) com uso de um ensaio de PCR direcionada ao alvo kDNA e revelação por eletroforese em gel de agarose 2% registraram resultados positivos em 92,1% de amostras de sangue periférico e em 92,9% de aspirado de medula óssea. Da mesma forma, Antinori et al. (2007) com uso de um ensaio de PCR e revelação por eletroforese em gel de agarose direcionado ao gene rSSU também detectou a LV com uma eficiência de 97,1% para o sangue periférico em crianças.

Quando foram avaliadas as amostras de pacientes portadores da co-infecção *Leishmania*/HIV o ensaio de PCR-ELISA kDNA proposto apresentou sensibilidade de 100%. Este resultado foi próximo ou superior aos valores de sensibilidade de 82% a 100% em reação de PCR e revelação por eletroforese em gel de agarose 2% com uso de aspirado de medula, descritos por Piarroux et al. (1994) e Lachaud et al. (2000); e superior ao apresentado por Fissore et al. (2004), que foi de 97% ao fazer uso de amostras de soro utilizando a reação de PCR. Para o diagnóstico da LV em pacientes imunossuprimidos, os exames moleculares adquirem grande importância, pois os exames sorológicos que avaliam a presença de anticorpos tendem a ser menos sensíveis devido a baixa resposta humoral. Estima-se que o número de anticorpos nos indivíduos co-infectados é 50 vezes menor do que nos imunocompetentes (Mary et al., 1992) e que a sorologia é positiva em somente metade dos casos (Rosenthal et al., 1995).

Na avaliação pelo ensaio de PCR-ELISA kDNA todos os indivíduos assintomáticos incluídos no estudo foram positivos e somente dois indivíduos não infectados apresentaram resultados positivos, sendo caracterizados como falso-positivos. O ensaio de PCR-ELISA kDNA apresentou concordância de 100% na caracterização de indivíduos assintomáticos quando os mesmos foram caracterizados pelas técnicas DAT, ELISA e PCR em tempo real direcionada para o alvo SSU rRNA. A caracterização prévia desses indivíduos por testes moleculares pode ter favorecido a elevada sensibilidade do ensaio de PCR-ELISA kDNA neste grupo. Apesar disso, o ensaio de PCR-ELISA kDNA demonstrou ser um método indicado para a busca e acompanhamento de indivíduos assintomáticos, principalmente em inquéritos epidemiológicos em que há um número maior de indivíduos para serem avaliados. Estes

resultados discordam dos resultados apresentados por Alborzi et al. (2008) que, ao avaliarem a capacidade diagnóstica dos ensaios PCR-ELISA, RIFI e intradermoreação em 388 indivíduos assintomáticos para LV, concluíram que o ensaio de PCR-ELISA não é um bom teste confirmatório para diagnóstico em assintomáticos. Ainda, o diagnóstico molecular da LV em assintomáticos tem sido de grande importância, pois além de permitir o acompanhamento precoce dos indivíduos que adquirem a doença, permite o monitoramento da terapêutica proposta e a avaliação das ações dos programas de controles da doença (Moreno et al., 2005; Moreno et al., 2006). O principal método de diagnóstico de uso atualmente na avaliação de assintomáticos é a reação sorológica de ELISA. Gontijo e Melo (2004) relacionam o ELISA como um método de diagnóstico pouco sensível para a detecção de assintomáticos. Em um estudo realizado por Romero et al., (2009) não foi possível estabelecer um método de escolha para o diagnóstico em assintomáticos, devido à baixa concordância entre os métodos sorológicos utilizados: ELISA com antígeno bruto, ELISA com antígeno recombinante (rK39 e rk26), imunofluorescência indireta e teste imunocromatográfico utilizando antígeno rK39. A grande discordância entre as técnicas sorológicas comprovam que os antígenos reconhecidos por indivíduos assintomáticos são muito variáveis e que a utilização isolada de métodos sorológicos podem subestimar as verdadeiras taxas (Marques, 2010).

A caracterização das amostras de indivíduos de área endêmica no presente estudo foi realizada por testes sorológicos e moleculares que apresentam elevada sensibilidade e especificidade. A elevada discordância dos resultados destes testes apresentadas nos estudos de prevalência em assintomáticos de LV demonstram a dificuldade de caracterizar satisfatoriamente este grupo de indivíduos (Romero et al., 2009; Marques et al., 2010). A técnica molecular utilizada, qPCR, é considerada mais sensível que a técnica de PCR-ELISA (Rolão et al., 2004). Porém o alvo molecular utilizado no qPCR (rSSU) (Marques et al., 2010) é menos sensível que o alvo utilizado no presente ensaio de PCR-ELISA (kDNA), devido ao maior número de cópias apresentada no minicírculo do kDNA (Silva et al., 2010). Assim, as duas amostras positivas de indivíduos não infectados podem ser de indivíduos assintomáticos não identificados pelas técnicas utilizadas. Lachaud et al. (2002) avaliou diferentes alvos moleculares para detecção do DNA de *Leishmania* em amostras de sangue periférico, sendo um alvo do DNA ribossomal, dois alvos nucleares e três alvos do cinetoplasto e obtiveram maior sensibilidade com os alvos do kDNA.

O ensaio de PCR-ELISA kDNA demonstrou ser um método semi-quantitativo apresentando uma zona de indeterminação, determinada de acordo com valores de absorvância, em que 87,8% dos indivíduos assintomáticos e somente 12,3% dos portadores de LV são incluídos. A determinação mesmo que semi-quantitativa da carga parasitária permite diferenciar os portadores da infecção por *L. (L.) infantum* dos doentes. Esta diferenciação pode ser uma alternativa de se acompanhar a infecção e avaliar os resultados de um esquema terapêutico (Marques, 2010). Além disso, a carga parasitária pode ser útil na tomada de ação pela vigilância epidemiológica, uma vez que a identificação precoce dos indivíduos e seu tratamento é uma das estratégias do Ministério da Saúde para o controle da doença (Ministério da Saúde-Brasil, 2006).

Com a finalidade de gerar um kit de PCR-ELISA para leishmaniose a partir do ensaio proposto, a Gestão Tecnológica da Fundação Oswaldo Cruz (GESTEC-FIOCRUZ) está realizando a análise da invenção. Esta análise tem a finalidade de verificar a viabilidade do produto, estabelecer parcerias para que novos testes sejam realizados e também para que o produto possa ser liberado para a utilização nos diversos serviços de saúde. No entanto, existem normas rígidas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) que devem ser seguidas até que o produto seja liberado para utilização fora dos centros de pesquisas (Anvisa, 2006).

O ensaio de PCR-ELISA kDNA desenvolvido neste estudo apresentou elevada sensibilidade e especificidade, superioridade metodológica e operacional à da PCR com revelação em gel, além de possibilitar uma interpretação objetiva dos resultados. A técnica permite a análise de grandes quantidades de amostras clínicas, com o uso de equipamentos amplamente utilizados para processamento de séries de ELISA sendo adequada para o diagnóstico da LV na rotina de laboratórios clínicos de referência.

7 CONCLUSÃO

- Foi desenvolvido um ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção do kDNA amplificado de *L. (L.) infantum* em reação de PCR, estabelecendo condições padronizadas dos reagentes, limite de detecção e valor limite para positividade;
- O ensaio de PCR-ELISA kDNA, desenvolvido e validado neste estudo, apresenta simplicidade metodológica e operacional, permite interpretação objetiva da amplificação do DNA de *Leishmania* do complexo *Donovani* e oferece desempenho adequado para o diagnóstico da LV em laboratórios de referência;
- O ensaio de PCR-ELISA kDNA é um potencial candidato para uso na busca e acompanhamento de indivíduos assintomáticos, principalmente em inquéritos epidemiológicos em que há um número maior de indivíduos para serem avaliados;
- Foi desenvolvido um ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção do DNA amplificado do gene ACTB humano para uso como controle do processo de extração de DNA e amplificação por PCR em amostras avaliadas pelo ensaio de PCR-ELISA kDNA.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adhya S, Chatterjee M, Hassan MQ, Mukherjee S, Sen S. Detection of *Leishmania* in the blood of early Kala-azar patients with the aid of the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89: 622-4.

Akhtar N, Anand V, Verma KK, Sharma A. Augmented telomerase activity and reduced telomere length in parthenium-induced contact dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012 Sep 5. doi: 10.1111/j.

Alam MZ, Kuhls K, Schweynoch C, Sundar S, Rijal S, Shamsuzzaman AK, et al. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetic homogeneity of *Leishmania donovani* strains in the Indian subcontinent. *Infect Genet Evol* 2009; 9: 24-31.

Alborzi A, Pourabbas B, Shahian F, Mardaneh J, Pouladfar GR, Ziyaeyan M. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in the whole blood of asymptomatic individuals by PCR-ELISA and comparison with other infection markers in endemic areas, southern Iran. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79: 839-42.

Alencar JE, Neves J, Dietze R. Leishmaniose visceral. In: Veronesi R. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1991: 8ed. , p. 706-17.

Alonso DP, Costa DL, de Mendonça IL, Costa CH, Ribolla PE. Heterogeneity of *Leishmania infantum* chagasi kinetoplast DNA in Teresina (Brazil). *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82(5): 819-21.

Alvarenga JS, Ligeiro CM, Gontijo CM, Cortes S, Campino L, Vago AR, et al. KDNA genetic signatures obtained by LSSP-PCR analysis of *Leishmania (Leishmania) infantum* isolated from the new and the old world. *PLoS One* 2012; 7(8): e43363.

Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Magni C, et al. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2007; 44:1602-10.

Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 191-9.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) Resolução - RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003 D.O.U. 02/06/2003 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: [http://www.interfarma.org.br/site2/images/Site%20Interfarma/Informacoesdo setor/RE/Registro/2003/RE%20899-03-guia%20validacao.pdf](http://www.interfarma.org.br/site2/images/Site%20Interfarma/Informacoesdo%20setor/RE/Registro/2003/RE%20899-03-guia%20validacao.pdf). Acesso em: 19/04/2013.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução ANVISA Nº 206, de 17 de novembro de 2006. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b1295e00499991ce90dab66dcbd9c63c/RESOLU%C3%87%C3%83O+ANVISA+RDC+N%C2%BA+20606+REGISTRO+DE+PRODUTOS+IN+VITRO.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 15/01/2013.

Aoun K, Chouih E, Amri F, Alaya NB, Raies A, Mary C, et al. Short Report: Contribution of Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction to Follow-Up of Visceral Leishmaniasis Patients Treated with Meglumine Antimoniate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 81(6):1004-6.

Arora SK, Melby PC, Sehgal S. Identification of sero-specific epitope of recombinant heat shock protein (HSP70) of *Leishmania donovani*. *J Parasitol Dis* 2000; 24: 21-6.

Arora SK, Melby PC, Sehgal S. An epitope-specific PCR test for diagnosis of *Leishmania donovani* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102: 41-5.

Assis TSM, Caligiorne RB, Romero GAS, Rabello A. Detection of *Leishmania* kDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009 Dez; 103(13): 1269-72.

Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral Leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis* 1986a; 154(4): 639-49.

Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspective on a subclinical form of visceral Leishmaniasis. *J Infect Dis* 1986b; 154(6):1003-11.

Babiker ZO, Davidson R, Mazinda C, Kipnetich S, Ritmeijer K. Utility of lymph node aspiration in the diagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76(4): 689-93.

Banoo S, Bell D, Bossuyt P, Herring A, Mabey D, Poole F, et al. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4(9): 21-31.

Barbosa JR. Validação do kit KALAZAR DETECTTm (INBIOS) no diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral humana. Belo Horizonte (MG), 2010. Monografia - Fundação Ezequiel Dias.

Basset D, Faraut F, Marty P, Dereure J, Rosenthal E, Mary C, Pratlong F, et al. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. *Microbes Infect* 2005; 7(13): 1370-75.

Bern C, Jha SN, Joshi AB, Thakur GD, Bista MB. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 6:153-7.

Brandonisio O, Fumarola L, Maggi P, Cavaliere R, Spinelli R, Pastore G. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21(6): 461-4.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília: MS, 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a co-infecção *Leishmania*/HIV Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: MS, 2011a

Brasil. Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral: Recomendações clínicas para a redução da letalidade. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: MS, 2011b.

Brasil. Ministério da Saúde. Datasus. Informações de Saúde. Morbidade e informações

epidemiológicas.

Disponível

em:

<http://www.datasus.gov.br/cgi/defptohtm.exe?Idb2011/d0205.def> . Acesso: 10/12/2012.

Brasil. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Situação epidemiológica. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561. Acesso: 26/01/2013

Braz RF, Nascimento ET, Martins DR, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, et al.. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of american visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67: 344-8.

Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaró R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(2): 775-9

Cabrera L, De Witte J, Victor B, Vermeiren L, Zimic M, Brandt J, et al.. Specific detection and identification of African trypanosomes in bovine peripheral blood by means of a PCR-ELISA assay. *Vet Parasitol*. 2009; 164(2-4):111-7.

Cahil KM. Field technique in the diagnosis of calazar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1970; 83: 99.

Carvalho SF, Lemos EM, Corey R, Dietze R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 321-4.

Chen BY, Janes HW. *PCR cloning protocols*. 2 ed. Humana Press. 2002; 192: 439pp.

Chulay JD, Bryceson AD. Quantitation of amastigotas of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32: 475-9.

Costa CH, Tapety CM, Werneck GL. Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40: 415-9.

Costa JM, Durand R, Deniau M, Rivollet D, Izri M, Houin R, et al. PCR enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* 1996 Jul; 34(7): 1831-3.

Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, Oliveira Neto MP, Brito MEF, Falqueto A, et al. Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; 41(7): 3126-32.

Cupolillo E. Avanço dos estudos moleculares de *Leishmania (Leishmania) chagasi* aplicados ao diagnóstico de LV no Brasil. Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas 2005: 57-62.

Dantas TVM. Desenvolvimento e padronização de ELISA indireto para diagnóstico de MAEDI-VISNA vírus de ovinos. [Dissertação] Fortaleza (CE): Universidade Estadual do Ceará; 2004.

Dantas-Torres F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Mem Inst Oswald Cruz* 2006; 101:117-8.

Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *British Med J* 2003; 356: 377-82.

Deane LM, Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1996; 4(3): 198-212.

Deborggraeve S, Boelaert M, Rijal S, De Doncker S, Dujardin JC, Herdewijn P, et al. Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical visceral leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease. *Trop Med Inf Hearth* 2008; 13:1378-83.

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing *Leishmania* – a mini-review. *Men Inst Oswald Cruz* 1994; 89: 463-9.

Delgado O, Feliciangeli MD, Coraspe V, Silva S, Perez A, Arias J Value of a dipstick based on recombinant rk39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis

from other sympatric endemic diseases in Venezuela. *Parasite* 2001; 8(4): 355-7.

Deniau M, Cañavate C, Faraut-Gambarelli F, Marty P The biological diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 1 (97): 391-5.

Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis* 1997; 25(5): 1240-2.

Disch J, Maciel FC, de Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. *Trans R Trop Med Hyg* 2003; 97: 1-5.

Disch J, Oliveira MC, Orsini M, Rabello A Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 2004; 92: 279-283.

De Doncker S, Hutse V, Abdellati S, Rijal S, Singh Karki BM, Decuypere S, et al. A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99: 25-31.

Duarte MI, da Matta VL, Corbett CE, Laurenti MD, Chebabo R, Goto H. Interstitial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83(1): 73-6.

Duxbury RE, Sadun EH. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1964; 13: 525-9.

Elamin EM, Guizani I, Guerbouj S, Gramiccia M, El Hassan AM, Di Muccio T, et al. Identification of *Leishmania donovani* as a cause of cutaneous leishmaniasis in Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102(1): 54-7.

El Harith A, Kolk AHJ, Kager PA. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80(4): 583-7.

El Harith A, Kolk AH, Kager PA, Leeuwenburg J, Muigai R, Kiugu S, et al. Improvement of

a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1988 Jul; 26(7):1321-25.

Ferreira AW & Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Figueiro-Filho EA, Duarte G, El-Beitune P, Quintana SM, Maia TL. Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2004; 12(1): 31–40.

Fisa R, Riera C, López-Chejade P, Molina I, Gállego M, Falcó V, et al. *Leishmania infantum* DNA detection in urine from patients with visceral leishmaniasis and after treatment control. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78: 741-4.

Fissore C, Delaunay P, Ferrua B, Rosenthal E, Del Giudice P, Aufreuve JP, et al. Convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5332-3.

Foundation for innovative new diagnostic (FIND). Project Management Standard Operating Procedure. Disponível em: http://www.finddiagnostics.org/export/sites/default/about/how/qualitymanagement/projectmanagement/sop/FIND_PM_SOP_ShortVersion_28MAR11.pdf. Acesso em: 15/01/2013.

Fraga TL, Brustoloni YM, Lima RB, Dorval ME, Oshiro ET, Oliveira J, et al. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010 May; 105(3): 310-3.

Franchini G, Mantovani M. Di un nuovo parassita protozoario trovato nel sangue periferico ed epatico in un caso di infezione cronica mortale proveniente dal Brasile. *Annals Medicine Naval de Colon* 1913; 19: 125-35.

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.

Gomes LI, Dos Santos Marques LH, Enk MJ, de Oliveira MC, Coelho PM, Rabello A. Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of schistosoma infection in feces. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4(4): e664.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol 2004; 7 (3): 338-49.

Graça GC, Volpini AC, Romero GA, de Oliveira Neto MP, Hueb M, 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

Gregori F. Desenvolvimento e avaliação de um método de ELISA para a detecção de rotavírus a partir de material fecal. [Dissertação] São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1999.

Gregori F, Brandão PE, Rosales CAR, Cortez A, Heinemann MB, Richtzenhain LJ et al. Desenvolvimento e avaliação de um método de ELISA para a detecção de rotavírus a partir de material fecal. Arquivos do Instituto Biológico São Paulo 2000; 67 (2): 191-4.

Guerbouj S, Guizani I, Speybroeck N, Le Ray D, Dujardin JC. Genomic polymorphism of *Leishmania infantum*: a relationship with clinical pleomorphism? Infect Genet Evol 2001 Jul; 1 (1):49-59.

Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment, and proposed research and development agenda. Lancet 2002; 2: 494-501.

Guimarães SF, Lemos EM, Corey R, Dietze R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 2003; 3: 321-4.

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. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008; 60: 33-42.

Hassan M, Sanad MM, el-Karamany I, Abdel-Tawab M, Shalaby M, el-Dairouty A, et al. Detection of DNA of *W. bancrofti* in blood samples by QC-PCR- ELISA-based. J Egypt Soc Parasitol 2005; 35 (3): 963-70.

Ho EA, Soong T, Li Y. Comparative merits of sternum, spleen, e liver punctures in the study of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1948 Mar; 41(5): 629-36.

Hong Y, Berrang ME, Liu T, Hofacre CL, Sanchez S, Wang L, et al.. Rapid Detection of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, and *Salmonella entérica* on Poultry arcasses by Using PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Appl Environ Microbiol. 2003; 10 (6): 3492–9.

Hoya RD, Trujillo CE, Cardenas C, Puentes F, Patarroyo ME, Murillo LA. Leishmania panamensis: a 44bp deletion in gp63 gene is found in cDNA and genomic libraries. Men Inst Oswald Cruz 1999; 94 (5): 641-3.

Huang YK, Fan XG, Qiu F, Wang ZM Combined Detection of mRNA Expression of Alpha-Fetoprotein in Peripheral Blood and Telomerase Activity of Monocytes in Hepatocellular Carcinoma Patients. Hepatogastroenterology 2012; 60: 121.

Islam MZ, Itoh M, Mirza R, Ahmed I, Ekram AR, Sarder AH, et al. Direct agglutination test with urine samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 2004; 70(1):78-82.

Jones ME, Fox AJ, Barnes AJ, Oppenheim BA, Balagopal P, Morgenstern GR, et al. PCR-ELISA for the early diagnosis of invasive pulmonary aspergillus infection in neutropenic patients. J Clin Pathol 1998; 51 (9): 652-6.

Kobets T, Badalová J, Grekov I, Havelková H, Svobodová M, Lipoldová M. *Leishmania* parasite detection and quantification using PCR-ELISA. Nat Protoc 2010; 5 (6): 1074-80.

Kurkjian KM, Vaz LE, Haque R, Cetre-Sossah C, Akhter S, Roy S, et al. Application of an improved method for the recombinant K39 enzyme-linked immunosorbent assay to detect visceral leishmaniasis disease and infection in Bangladesh. Clin Diag Lab Immunol 2005; 12: 1410-5.

Lachaud L, Dereure J, Chabbert TE, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E, et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with

special reference to AIDS patients. J Clin Microbiol 2000; 38: 236-40.

Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. J Clin Microbiol 2002; 40 (1): 210-5.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. British Med Bull 1972; 28: 44-8.

Landgraf A, Reckmann B, Pingoud A. Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linked immunosorbent assay techniques. Anal Biochem 1991; 98: p.86-91.

Lqbal J, Hira PR, Saroj G, Philip R, Al-Ali, F. Mada, PJ, et al. Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. J Clin Microbiol 2002; 40 (2): 475-9.

Luk JM, Kongmuang U, Tsang RS, Lindberg AA. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay To Detect PCR Products of the rfbS Gene from Serogroup D Salmonellae: a Rapid Screening Prototype J Clin Microbiol 1997; 35(3): 714–8.

Lüneberg E, Jensen JS, Frosch M. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by polymerase chain reaction and nonradioactive hybridization in microtiter plates. J Clin Microbiol 1993; 31:1088–94.

Luz KG, Silva VO da, Gomes EM, Machado FC, Araujo MA, Fonseca HE, et al. Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. Am J Trop Med Hyg 1997 Ago; 57(2): 168-71.

Lyons S, Veeken H, Long J. Visceral leishmaniasis and HIV in Tigray, Ethiopia. Trop Med Int Health 2002; 8: 733-9.

Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Ben Salah A, Bahloul C, Amri F, et al. Comparative evaluation of Elisas based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of mediterranean visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 2003; 68: 312-20.

Maciel BL, Lacerda HG, Queiroz JW, Galvão J, Pontes NN, Dimenstein R, et al. Association of nutritional status with the response to infection with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79: 591-8.

Paiva-Cavalcanti M, Regis-da-Silva CG, Gomes YM. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop.* 2010; 16 (4): 537-42.

Peruhype-Magalhães V, Machado-de-Assis TS, Rabello A. Use of the Kala-Azar Detect[®] and IT-LEISH[®] rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107(7): 951-2.

Maia Z, Lírio M, Mendes CMC, Mehta SR, Badaró R. Comparative study of Rk39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with metaanalysis. *PLOS Negl Trop Dis* 2012; 6 (1): 1-8.

Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM de, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saúde Pública* 2008; 24 (12): 2941-7.

Marques LH dos S. Determinação da taxa de infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* utilizando técnicas sorológicas e diagnóstico molecular quantitativo em crianças residentes em área urbana de expansão da Leishmaniose Visceral. [Dissertação]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2010.

Martinez EZ, Louzada-Neto F, Pereira BB. A curva Roc para testes diagnósticos. *Cad Saúde Coletiva* 2003; 11 (1): 7-31.

Martín-Sánchez J, Lopez-Lopez MC, Acedo-Sanchez C, Castro-Fajardo JJ, Pineda J A, Morillas-Marquez F. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. *Parasitology* 2001 Jun; 122 (6): 607-15.

Martín-Sánchez J, Pineda JA, Andreu-Lopez M, Delgado J, Macías J, De La Rosa R, Morillas-Márquez F. The high sensitivity of a PCR-ELISA in the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 96 (7): 669-77.

Martín-Sánchez J, Francisco MM, inventores. Kit para diagnóstico específico de las leishmaniosis causadas por "*Leishmania infantum*" por la técnica de PCR-ELISA. Espanha patente CI- C12Q 1/68. 01 nov 2003.

Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumom H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity J Clin Microbiol 2004; 42 (11): 5249-55.

Mary C, Lamouroux D, Dunan S, Quilici M. Western Blot análisis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potencial of the 14-KD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. Am J Trop Hyg 1992; 47: 764-71.

Matthiesen SH, Hansen CM. Fast and Non-Toxic In Situ Hybridization without Blocking of Repetitive Sequences. PLoS ONE 2012; 7 (7): e40675.

Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol Today 2000; 16: 188–9.

Maurya R, Singh RK, Kumar B, Salotra P, Rai M, Sundar S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assesment of cure. J Clin Microbiol 2005; 43 (7): 3038-41.

Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e Perspectivas. Rev Bras Parasitol Vet 2004; 23 (1): 41- 45.

Meredith SE, Kroon NC, Sondorp E, Seaman J, Goris MG, Van Ingen CW, et al. Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. J Clin Microb 1995 ; 33(7): 1742–45.

Michalick MSM, Genaro O. Leishmaniose Visceral Americana. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA (Ed) Parasitologia humana 11 ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005, P. 56-72.

Migone LE. Un cas de Kalazar en Assuncion (Paraguay). Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique 1913; 6: 118-20.

Minozzo JC, Thomaz-Soccol V, Olortegui CC, Soares VE, da Costa AJ. Teste imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay) para diagnóstico da cisticercose bovina e estudo da cinética de produção de anticorpos contra-Cysticercus bovis. Cienc. Rural 2004; 34 (3): 857-64.

Morata P, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, García-Ordoñez MA, Ana Cárdenas A, Colmenero JD. Development and Evaluation of a PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Human Brucellosis J Clin Microbiol 2003; 41(1): 144–8.

Moreno E, Melo MN, Antunes CMF, Lambertucci Jr, Serufo JC, Andrade-Ribeiro As, et al. Epidemiologia Da Leishmaniose Visceral Humana Assintomática Em Área Urbana, Sabará, Minas Gerais, 1998-1999. Inf Epidemiol Sus 2002; 11: 37-9.

Moreno E, Melo Mn, Genaro O, Lambertucci Jr, Serufo Jc, Andrade ASR, et al. Risk factors for Leishmania chagasi infection in na urban área of Minas Gerais State. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38:456- 63

Moreno E, Melo MN, Genaro O, Lambertucci Jr, Serufo JC, Andrade ASR, et al. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in na urban área of Minas Gerais State, Brazil, using serological and molecular biology techniques. Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39: 421-7.

Mortarino M, Franceschi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C. Quantitative PCR in the diagnosis of Leishmania. Parassitologia. 2004; 46(1-2): 163-7.

Musiani M, Gallinella G, Simona V, Zerbini M. Competitive PCR-ELISA protocols for the quantitative and the standardized detection of viral genomes. Nat Protoc 2007; 2 (10): 2511-9.

Musso O, Sommer P, Drouet E, Cotte L, Neyra M, et al. In situ detection of human cytomegalovirus DNA in gastrointestinal biopsies from AIDS patients by means of various PCR-derived methods. J Virol Methods 1996; 56: 125–137.

Nozawa CM, Kerntopf GF, Czernisz Eda S, Albuquerque D, Romanin P, Freitas JF, et al.. Detection and characterization of human rotavirus in hospitalized patients in the cities of Ponta Grossa, Londrina and Assai - PR, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2010; 14(6): 553-7.

Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, Smith D. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from 75 clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (10): 2877-84.

Oliveira ALL de, Paniago AMM, Dorval MEC, Oshiro ET, Leal CR, Sanches M, et al. Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39(5): 446-50.

Oliveira ARR. Quantificação de ADN nuclear e ADN mitocondrial por PCR em tempo real.[Dissertação]. Lisboa (Portugal): Universidade de Lisboa; 2010.

Oliveira E, Pedras MJ, De Assis IE, Rabello A. Improvement of direct agglutination test (DAT) for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103(12): 1279-81.

Oliveira E, Saliba SW, Andrade CF, Rabello A. Direct agglutination test (DAT): Improvement of biosafety for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011; 105(7): 414-6.

Organização Mundial da Saúde. Leishmaniasis: worldwide epidemiological and drug access update Leishmaniasis: epidemiology and access to medicines Geneva 30 maio 2102. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_worldwide_epidemiological_and_drug_access_update.pdf. Acesso em: 23/09/2012.

Organização Mundial da Saúde. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf Acesso em: 25/01/2013.

Paiva BR, Passos LN, Falqueto A, Malafronte RS, Andrade HF. Single step polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of the Leishmania (Viannia) subgenus. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 2004; 46(4): 335-338.

Palermo FA, Cocci P, Angeletti M, Polzonetti-Magni A, Mosconi G PCR-ELISA detection of estrogen receptor β mRNA expression and plasma vitellogenin induction in juvenile sole (*Solea solea*) exposed to waterborne 4-nonylphenol. Chemosphere. 2012; 86(9): 919-25.

Pedras MJ, Viana LG, Oliveira EJ de, Rabello A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rk39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 2008; 102: 172-8.

Pearson RD, Sousa AQ. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. Clin Infect Disease 1995; 2: 113.

Pedrosa CM, Rocha EM da. Clinical and epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in children up to 15 years of age in Alagoas, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 2004; 37(4): 300-4.

Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., Hays, J.P. Principles and technical aspects of PCR amplification, Springer. 2008. 332 pp.

Penna HA. Leishmaniose visceral no Brasil. Brasil-Medico 1934; 48: 949-950. Retratação em: Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília: MS, 2006: 9.

Pereira-Chioccola VL. Diagnóstico molecular das leishmanioses: contribuição ao Programa de Vigilância e Controle da LVA no Estado de São Paulo Molecular diagnosis of leishmaniasis: contribution to the American Visceral Leishmaniasis Surveillance Program in Sao Paulo State Bepa 2009; 6(68): 4-13.

Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, et al. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. J Clin Microbiol 1994; 32: 746-9.

Pirmez C, Trajano VS, Neto MP, Da-cruz AM, Gonçalves SC, Catanho M, et al. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (6): 1819-23.

Prefeitura de Belo Horizonte. Informações sobre Leishmaniose. Disponível em: http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saudef&tax=12768&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&. Acesso: 04/03/2103.

Queipo-Ortuño MI, Garcia-Ordoñez MA, Gil R, Rojas J, Colmenero J de Dios, Morata P. PCR-DIG ELISA with biotinylated primers is unsuitable for use in whole blood samples from patients with brucellosis. *Mol Cell Probes* 2004; 18: 243-50.

Rafati S, Gholami E, Hassani N, Ghaemimanesh F, Taslimi Y, Taheri T, et al.. *Leishmania* major heat shock protein 70 (HSP70) is not protective in murine models of cutaneous leishmaniasis and stimulates strong humoral responses in cutaneous and visceral leishmaniasis patients. *Vaccine*. 2007; 25 (21): 4159-69.

Raji N, Sadeghizadeh M, Tafreshi KN, Jahanzad E. Detection of human Papillomavirus 18 in cervical cancer samples using PCR-ELISA (DIAPOPS). *Iran J Microbiol*. 2011; 3(4): 177-82.

Ritmeijer K, Melaku Y, Mueller M, Kipnetich S, O'Keeffe C, Davidson RN. Evaluation of a new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74: 76-80.

Rodgers MR, Popper S J, Wirth DF. Amplification of Kinetoplast DNA as a Tool in the Detection and Diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 1990; 71: 267-5.

Rolão N, Cortes S, Rodrigues OR, Campino L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Parasitol* 2004; 90(5):1150-4.

Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Cupolillo E, Bentintoaldo C, Macedo VO, et al. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the 76 diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *Acta Trop* 2001; 79: 225-9.

Romero HD, Silva Lde A, Silva-Vergara ML, Rodrigues V, Costa RT, Guimarães SF, et al. Comparative study of serological tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81(1): 27-33.

Rosenthal E, Marty P, Poizot-Martin I, Reynes J, Pratlong F, Lafeuillade A, et al. Visceral Leishmaniasis and HIV-1 co-infection in southern France. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89(2): 159-62.

Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000;132: 365-86.

Salotra, P, Sreenivas G, Ramesh V, Sundar S. A simple and sensitive test for field diagnosis of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Br J Dermatol.* 2001; 2:630.

Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffman MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1998; 12: 315-7.

Santos N, Honma S, Timenetsky STMC, Linhares AC, Ushijima H, Armah GE, et al. . Development of a microtiter plate hybridization-based pcr–enzyme-linked immunosorbent assay for identification of clinically relevant human group a rotavirus g and p genotypes. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (2):462–9.

Schallig HD, Oskam L 2002. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Int Health.* 2002; 7: 641-651.

Sengupta PC. Immunodiagnosis of calazar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1969; 63: 46.

Silva MAL, Medeiros RA, Filho SB, Melo LF, Medeiros Z. Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Revista Eletrônica de Farmácia* 2010; v. 7 (3): 01 - 15.

- Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006 Mar; 123 (3): 311-30.
- Sousa-Gomes ML, Maia-Elkhoury ANS, Pelissari DM, Junior FEFL, Sena JM, Cechinel MP. HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais *Epidemiol. Serv. Saúde* 2011; 20(4):519-26.
- Spanakos G, Patsoula E, Kremastinou T, Saroglou G, Vakalis, N. Development of a PCR-based method for diagnosis of *Leishmania* in blood samples. *Mol Cell Probes* 2002; 16: 415-20.
- Srivastava P, Mehrotra S, Tiwary P, Chakravarty J, Sundar S. Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. *PLoS One.* 2011; 6(4): e19304
- Sundar S, Raí M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 951-8.
- Sundar S, Reed SG, Singh R, Kumar PC, Murray HW. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet* 1998; 351: 563-5.
- Tahk H, Lee MH, Lee KB, Cheon DS, Choi C. Development of duplex RT-PCR-ELISA for the simultaneous detection of hepatitis A virus and hepatitis E virus. *J Virol Methods* 2011; 175(1):137-40.
- Teles JAA, Campos AC, da Silva KPC, Santos AS. Desenvolvimento e avaliação de um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos. *Pesq Vet Bras* 2012; 32(9): 838-42.
- Urias EVR, Carvalho SFV, Iliveira CR, Carvalho MR, Teles LF, Rodrigues MC, et al. Prevalencia de adultos infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007; 31(5): 348-54.

Vesanen M, Piiparinen H, Kallio A, Vaheri A. Detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid samples using the polymerase chain reaction and microplate hybridization. *J Virol Methods* 1996; 59: 1-11.

Viana LG de, Assis TSM de, Orsini M, Silva AR da, Souza GF de, Caligiorne R, et al. Combined diagnostic methods identify a remarkable proportion of asymptomatic *Leishmania (Leishmania) chagasi* carriers who present modulated cytokine profiles. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102: 548-55.

Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 2004; 90: 31-7.

Wu Z, Bao Y, Yu M, Lu L, Zhang Y. An experimental study on application of PCR in detection of Kala-azar. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997; 28: 167-72.

Zijlstra EE, Siddig AM, El-Hassan AM, El-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, Kager PA. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 505-7.

Zijlstra EE, Nur Y, Desjeux P, Khalil EA, El-Hassan AM, Groen J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 6: 108-113.