

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS  
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

MONIQUE PAIVA DE CAMPOS

**COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DE PELE ÍNTEGRA PARAFINADA E  
CONGELADA ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE -  
QUANTITATIVA (qPCR) NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL  
CANINA**

Rio de Janeiro

2014

**COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DE PELE ÍNTEGRA PARAFINADA E  
CONGELADA ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE -  
QUANTITATIVA (qPCR) NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL  
CANINA**

MONIQUE PAIVA DE CAMPOS

Dissertação apresentada ao curso  
de pós-graduação em doenças  
infecciosas do Instituto de  
Pesquisa Clínica Evandro Chagas  
para obtenção do grau de Mestre  
em Ciências

Orientadores: Dr. Fabiano Borges  
Figueiredo e Dra. Maria de Fátima  
Madeira

Rio de Janeiro

2014

A Deus pela vida.  
A minha família e amigos pelo apoio e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pelas bênçãos que me foram dadas, com certeza sem Ele nada disso seria possível.

A minha mãe, Elma, que sempre foi meu exemplo de força e determinação, me ensinou a nunca desistir e fazer tudo com honestidade e dedicação.

Aos meus tios e minha prima Paula, pelo apoio, casa e paciência dedicada a mim.

Agradeço a minha família pelo apoio e força tanto nos bons e maus momentos, obrigada pela compreensão nos momentos de ausência e alegrias nos momentos de união.

Agradeço a Dra. Denise Amaro da Silva pela amizade, parceria e ensinamentos. Essa vitória é nossa.

Agradeço a todos, do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses (LAPCLIN-DERMZOO) que sempre estiveram comigo, nos momentos de alegrias e desespero, me apoiando sempre. Vocês são minha segunda família.

Agradeço ao Dr. Fabiano Borges Figueiredo e a Dra. Maria de Fátima pela confiança e dedicação. Obrigada por acreditarem no meu sonho e sempre me apoiarem.

Agradeço ao Dr. Otavio de Melo Espíndola pela paciência e ensinamentos que possibilitaram a realização deste trabalho.

Agradeço a Manuela Solcà e Keitty Pereira pelo apoio e suporte, sempre me auxiliando nas técnicas e dúvidas.

Agradeço a todos os animais que fizeram parte do estudo, sem vocês nada seria possível.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

“Concede-me, Senhor, a serenidade necessária  
para aceitar as coisas que não posso modificar,  
coragem para modificar as que eu posso  
e sabedoria para distinguir uma da outra”

CAMPOS, M. P. **Comparação entre amostras de pele íntegra parafinada e congelada através da reação em cadeia da polimerase - quantitativa (qPCR) no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** Rio de Janeiro, 2014. 48f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) representa um importante problema de saúde pública no Brasil. Podem acometer os seres humanos e mamíferos silvestres e domésticos, sob a forma de doenças infecciosas crônicas com uma ampla gama de manifestações clínicas. O diagnóstico laboratorial é requerido para confirmar a suspeita clínica. Atualmente as técnicas moleculares baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm demonstrado alta especificidade e sensibilidade. Na literatura existem diversos relatos da utilização da PCR com diferentes tipos de material clínico, alvos moleculares, conservação das amostras. Alguns autores consideram amostras congeladas mais vantajosas em relação às amostras fixadas em formol e embebidas em parafina (FFPE). No entanto, muitos pesquisadores defendem a importância das amostras FFPE devido à facilidade de conservação e possibilidade de utilização da PCR em estudos retrospectivos. O objetivo desse projeto foi avaliar a acurácia da qPCR realizada em amostras de pele íntegra congelada e parafinada. Trata-se de um estudo de validação, com 50 amostras de tecido congelado e 50 de tecido parafinado, provenientes de cães da cidade de Belém-PA. De cada animal foram coletados fragmentos de pele íntegra, sendo um dos fragmentos congelado e outro conservado por parafinização. As amostras de pele íntegra analisadas foram coletadas da região escapular utilizando *punch* de 3 mm. A qPCR foi orientada para alvos do kDNA da espécie *Leishmania infantum*. A extração de DNA de amostras de pele íntegra FFPE foi realizada com o “kit” comercial QIAamp® DNA FFPE Tissue (Qiagen, Califórnia, USA) de acordo com as recomendações do fabricante e para as amostras de tecido congelado foi utilizado o “kit” Illustra™ Tissue & Cells Genomicprep Mini spin (GE Healthcare), seguindo as recomendações contidas no “kit”. Os resultados obtidos demonstraram índices de sensibilidade e especificidade para as amostras FFPE de 63,7% e de 77,8%. Para as amostras congeladas foram de 100% e 45,9%, respectivamente. O índice *Kappa* obtido foi considerado fraco. A recuperação/concentração de DNA nas amostras FFPE foi baixa, mas os resultados obtidos indicam sensibilidade e especificidade moderados, demonstrando que é possível o diagnóstico da leishmaniose visceral canina com amostras FFPE.

**Palavras-chave:** Diagnóstico, PCR – real time, leishmaniose visceral canina, *Leishmania infantum*.

CAMPOS, M. P. Comparison between samples of paraffin and frozen intact skin by polymerase chain reaction - quantitative (qPCR) in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Rio de Janeiro, 2014. 48f. Master [Science dissertation in Clinic Research in Infectious Diseases] - Instituto de Pesquisa Clinica Evandro Chagas.

### ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a significant public health problem in Brazil. It affects humans, wild and domestic mammals, in the form of chronic infectious disease with a wide range of clinical manifestations. Laboratory diagnosis is required to confirm the clinical suspicion of VL. Currently, molecular techniques based on polymerase chain reaction (PCR) have shown high specificity and sensitivity. Some authors consider more advantageous the use of frozen samples in PCR due to the better quality of DNA, in relation to that of fixed in formalin and embedded in paraffin (FFPE) samples. However, many researchers argue describe the importance of FFPE samples, due to the facility of conservation and the possibility of using PCR in retrospective studies. The aim of this study was to evaluate the accuracy of the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) performed on intact frozen and FFPE skin samples. This is a validation study with 50 fresh tissue samples and 50 FFPE tissues of dogs from Belém-PA. From each animal fragments of intact skin were collected, being one of the frozen fragments and another saved by paraffinization. The samples analyzed were collected from intact skin of the scapular region using a 3 mm punch. The qPCR was oriented targets kDNA of *Leishmania infantum*. The DNA extraction from FFPE samples of normal skin was performed with the QIAamp® DNA FFPE Tissue kit (Qiagen, California, USA) "kit" business according to the manufacturer's recommendations and for samples of frozen tissue the "kit" used was Illustra™ Tissue & Cells Genomicprep Mini spin (GE Healthcare), according to the manufacturer's recommendations in "kit". The results showed sensitivity and specificity for FFPE samples of 63.7 % and 77.8 %. For frozen samples were 100% and 45.9 %, respectively. The Kappa index obtained was considered weak. The recovery/concentration of DNA in FFPE samples was low, but the results indicate moderate sensitivity and specificity, demonstrating that it is possible the diagnosis of canine visceral leishmaniasis from FFPE samples.

**Keywords:** Diagnostic, PCR - real time, canine visceral leishmaniasis, *Leishmania infantum*.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantificação de DNA de tecido congelado e FFPE (ng/ $\mu$ L).....	21
Tabela 2 - Comparação entre os resultados da qPCR e do padrão de referência utilizando amostras de tecido congelado .....	21
Tabela 3 - Comparação dos resultados da qPCR entre o padrão de referência e as amostras de tecido FFPE.....	22
Tabela 4 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da qPCR utilizando amostras de DNA de pele congelada e FFPE.....	23
Tabela 5 - Comparação entre os resultados da qPCR utilizando amostras de tecido congelado e FFPE.....	23
Tabela 6 - Mediana da carga parasitária de <i>L. infantum</i> /ng de DNA de tecido congelado e de FFPE determinada através da qPCR.....	24
Tabela 7 - Resultado das amostras discordantes entre padrão de referência e qPCR comparados com a sorologia.....	24

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curva-padrão de amplificação de região do kDNA de *L. infantum* .. 19

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA - Albumina sérica bovina/ Bovine serum albumin

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

Cq - Ciclo de quantificação

DPP® - Tecnologia de dupla plataforma/*Dual-Path platform technology*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA/EIE- Ensaio imunoenzimático

FFPE - Fixada em formol e embebida em parafina/ *Formalin-fixed paraffin-embedded*

Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz.

gEq - Equivalente genômico

HE - hematoxilina-eosina

IFI - Imunofluorescência Indireta

IHQ - Imunohistoquímica

IPEC - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

kDNA - DNA de cinetoplasto

LAPCLIN-DERMZOO - Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos

LTA - Leishmaniose tegumentar americana

LVA - Leishmaniose visceral americana

LVC - Leishmaniose visceral canina

MLEE – Eletroforese de enzimas/ *Multi locus enzyme electrophoresis*

NNN – Meio de cultura Novy, Nicolle e McNeal

PCR - Reação em cadeia da polimerase/ *Polymerase chain reaction*

PBS – Salina fosfatada tamponada/ *phosphate buffered saline*

qPCR - PCR quantitativa

µm - Micrometro

µl – Microlitro

ng – Nanograma

SPSS – *Statistical Package for the Social Science*

TBE – Tris Borato EDTA

VPP – Valor preditivo positivo

VPN – Valor preditivo negativo

WHO – World health organization

OMS – Organização mundial de saúde

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. LEISHMANIOSES .....	1
1.2. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC).....	2
1.3. EPIDEMIOLOGIA .....	3
1.4. DIAGNÓSTICO .....	3
1.5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	5
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>8</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	9
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
4.1. DESENHO DO ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS .....	10
4.1.1. Critérios de Inclusão.....	10
4.1.2. Critérios de Exclusão.....	11
4.2. PADRÃO DE REFERÊNCIA DIAGNÓSTICA .....	11
4.3. REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE qPCR .....	12
4.3.1. Preparo dos cortes histológicos, extração e purificação de DNA a partir de amostras parafinadas.....	12
4.3.2. Extração e purificação de DNA a partir de amostras congeladas .....	13
4.3.3. Quantificação de DNA por fluorimetria .....	14
4.4. PCR QUANTITATIVA (qPCR).....	15
4.4.1. Confecção de curva-padrão para a determinação do número de cópias do genoma de <i>L. infantum</i> .....	15
4.4.2. Protocolo de amplificação de DNA por PCR em tempo real .....	16
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	18
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
5.1. RESULTADOS DO PADRÃO DE REFERÊNCIA DA POPULAÇÃO DE CÃES INCLUÍDOS NO ESTUDO .....	19
5.2. AVALIAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL PARA <i>L. infantum</i> .....	19
5.3. QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE DNA OBTIDAS .....	20
5.4. AVALIAÇÃO DA qPCR UTILIZANDO AMOSTRAS DE DNA DE TECIDO CONGELADO .....	21
5.5. AVALIAÇÃO DA qPCR UTILIZANDO AMOSTRAS DE DNA DE TECIDO FFPE.....	22
5.6. COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DA qPCR UTILIZANDO AMOSTRAS DE DNA DE TECIDO CONGELADO E FFPE.....	22
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>29</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>30</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. LEISHMANIOSES

As leishmanioses são zoonoses de grande importância em saúde pública no mundo, que acometem o homem e outras espécies de mamíferos silvestres e domésticos sob a forma de doenças infecciosas crônicas, apresentando diversas formas de manifestações clínicas (GRIMALDI & TESH, 1993).

As leishmanioses são causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), que são flagelados da Família *Trypanosomatidae*, Ordem *Kinetoplastida* (IMAM, 2009) e se caracterizam pela presença de mitocôndria incomum, contendo o cinetoplasto, cujo material genético, denominado kDNA, é composto por maxicírculos e minicírculos (BREWSTER, 1998).

Os casos de leishmanioses encontram-se distribuídos principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do Velho (Europa, Ásia e África) e do Novo Mundo (Américas), e os países em que são relatados casos de leishmaniose são: Brasil, Colômbia, Venezuela, Argentina, Guatemala, Nigéria, Etiópia, Quênia, Somália, Sudão, Iran, Iraque, Portugal, Espanha, Itália, dentre outros (WHO, 2010).

Nas Américas, as leishmanioses podem ser classificadas como: leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). A principal forma de transmissão dessa doença ocorre através da picada de insetos vetores da subfamília *Phlebotominae* e estão relacionadas entre as seis principais endemias do mundo (DEANE e DEANE, 1962; MARZOCHI e MARZOCHI, 1994a; WHO, 2010).

A infecção dos vetores ocorre durante a ingestão das fêmeas, ao sugarem o sangue de hospedeiros contendo macrófagos infectados com as formas amastigotas do parasito. No trato digestivo anterior destes insetos ocorre o rompimento dos macrófagos e liberação dos parasitos, que sofrem rápida diferenciação para formas flageladas, denominadas de promastigotas, que se reproduzem por sucessivos processos de divisão binária (GONTIJO e MELO, 2004).

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo do vetor, onde as formas promastigotas presentes no tubo digestivo deste são inoculadas na pele. Uma vez no tecido, estes parasitos são internalizados por fagócitos, e dentro do vacúolo parasitóforo se diferenciam para formas amastigotas. (REY, 1991).

## 1.2. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)

No Brasil, a LVA é causada por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, atualmente denominada *Leishmania (Leishmania) infantum* (KUHLIS, 2011), tendo como principal vetor *Lutzomyia longipalpis*, e o cão (*Canis familiaris*) como reservatório no ambiente doméstico e peridoméstico, ambos contribuindo para o ciclo de manutenção da doença (FRANÇA-SILVA *et al.*, 2005). *Lutzomyia cruzi* também foi descrita no Estado do Mato Grosso do Sul exercendo esse papel (GALATI *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 1998).

No cão, a doença tem um curso lento e de caráter crônico, sendo observado um amplo espectro de sinais clínicos, e está relacionada com a imunocompetência do animal. Nas fases mais adiantadas da doença observam-se frequentemente onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, rinorréia, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômitos, além de hiperqueratose. No estágio final da infecção, ocorre em geral paresia dos membros posteriores, caquexia, inanição e morte (DEANE e DEANE, 1955; MARZOCHI *et al.*, 1985; ALMEIDA *et al.*, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

No entanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo, sendo a forma assintomática relatada em proporções que podem representar cerca de 40% a 60% da população soropositiva (MARZOCHI e MARZOCHI, 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Após a avaliação clínica e laboratorial, os cães podem ser classificados em quatro estágios: O primeiro estágio corresponde aos cães expostos, que apresentam diagnóstico parasitológico negativo, bem como baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* e clinicamente normais ou apresentando sinais associados com outras doenças; o segundo estágio são os cães infectados, que apresentam exame parasitológico positivo, mas possuem baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*, são clinicamente saudáveis ou apresentam sinais clínicos compatíveis com outras doenças; terceiro estágio inclui os cães doentes, que possuem exames parasitológicos positivos e altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* com um ou mais sinais comuns na leishmaniose; e quarto estágio são os cães severamente doentes, com condições clínicas severas, nefropatia ou insuficiência renal crônica, alterações oftálmicas, articulares, entre outros (PALTRINIERI *et al.*, 2010).

O cão tem sido considerado o principal reservatório e fonte de infecção na área urbana. Por isso, como medida de controle, o Ministério da Saúde preconiza a eutanásia de cães com diagnóstico positivo para LVC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Além disso, tem sido descrito que a enzootia canina precede a ocorrência de casos em humanos, e que a

prevalência de infecção é maior em cães que em humanos (DEANE & DEANE, 1955; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994B; PARANHOS-SILVA et al., 1996; GALIMBERTTI et al., 1999; PALATINIK-DE-SOUZA et al., 2001).

### 1.3. EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses são consideradas doenças tropicais negligenciadas e são endêmicas em 98 países. Anualmente, cerca de 58 mil pessoas são infectadas por agentes da LVA e 220 mil por agentes da LTA, no mundo. O Brasil é o sexto país em números de casos de ambas as leishmanioses com 1.500 a 4.800 casos por ano (de 1990 a 2005) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), e o número de óbitos provocados por esta doença, no mundo, variam de 20 a 40 mil por ano (WHO, 2010).

Desde 1980, casos de leishmaniose visceral, em humanos e em cães, vêm sendo relatados nas regiões Nordeste, Norte, Centro-oeste e Sudeste, sendo observado um processo de expansão, principalmente com o avanço em direção às áreas urbanas em regiões cuja notificação de casos se restringia às áreas rurais (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994b; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas, que foram encontradas infectadas nas regiões Nordeste e Sudeste, enquanto os marsupiais infectados têm sido descritos no Brasil e na Colômbia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Os marsupiais da espécie *Didelphis marsupialis* são frequentemente apontados como fonte de infecção por *L. infantum* (TRAVI et al., 1994).

### 1.4. DIAGNÓSTICO

Atualmente, o diagnóstico das leishmanioses é realizado através da associação de dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos, uma vez que a doença apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, o que dificulta a sua correta identificação (GONTIJO e MELO, 2004).

Os testes laboratoriais contam com ferramentas de diferentes complexidades, cuja aplicabilidade pode variar de acordo com a forma da doença (tegumentar ou visceral) ou da infraestrutura local. Os métodos parasitológicos incluem: identificação microscópica direta e isolamento do parasita em meio de cultura a partir de diferentes espécimes clínicos (GONTIJO e MELO, 2004). Em áreas endêmicas de leishmaniose visceral, os testes

sorológicos são usados como ferramenta nos inquéritos epidemiológicos para diagnóstico e posterior recolhimento dos cães positivos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Os espécimes clínicos coletados para o diagnóstico parasitológico dos cães suspeitos de LVC podem ser obtidos a partir de aspirado de medula óssea, baço, fígado, linfonodos e, em alguns casos, de fragmentos de pele íntegra, lesão ou vísceras obtidos a partir de biópsias (GONTIJO E MELO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

No exame parasitológico direto, a pesquisa de formas amastigotas é realizada em lâminas de impressão por aposição do material coletado na punção, após coloração pela técnica de Giemsa, Leishman ou Panótico. O exame parasitológico indireto visa o isolamento do agente infeccioso em meios apropriados, sendo comumente utilizado o meio Novy, MacNeal e Nicolle (NNN) acrescido do meio Schneider e suplementado com 10% de soro fetal bovino. Dada à especificidade de 100% e relativa sensibilidade, a cultura é considerada o padrão de referência (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Por sua vez, a análise histopatológica dos fragmentos de tecido coletados por biópsia também é de fundamental importância no diagnóstico das leishmanioses, pois permite a identificação das formas parasitárias e, concomitantemente, contribui para o diagnóstico diferencial (TAFURI et al., 2004).

Considerando os testes sorológicos, a detecção de resposta imune humoral específica pode ser realizada pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI) e/ou por ensaio imunoenzimático (ELISA) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), sendo estas técnicas mais comumente utilizadas em estudos epidemiológicos e inquéritos para medidas de controle da LVA, devido à facilidade da obtenção de amostras e aos baixos custos (NUNES et al., 2001; ALMEIDA et al., 2005).

Durante muitos anos, a IFI foi recomendada pelo Ministério da Saúde para confirmação diagnóstica da LVC, apresentando de 90 a 100% de sensibilidade e 80% de especificidade para amostras de soro (ALVES e BEVILACQUA, 2004). Segundo Ikeda-Garcia & Feitosa (2006), esta técnica é de execução fácil, rápida e de custo reduzido. Contudo, são observadas algumas desvantagens, tais como a impossibilidade de automação e a subjetividade na avaliação, que têm sido apontadas como fatores limitadores da utilização desta técnica em larga escala. Por outro lado, testes baseados em ELISA são passíveis de automação e da utilização de valores de referência, apresentando vantagens nesse aspecto (ROSATI et al., 2003).

Outra limitação dos testes sorológicos é a baixa especificidade, em decorrência de possíveis reações cruzadas com outros tripanosomatídeos como *L. (Viannia) braziliensis* e

*Trypanosoma cruzi* (TRONCARELLI *et al.*, 2009) e *Trypanosoma caninum* (MADEIRA *et al.*, 2009), pois apresentam uma relação filogenética muito estreita com *L. infantum*, podendo resultar em falso-positivos nos testes sorológicos. Por outro lado, resultados falso-negativos podem ocorrer por atraso no período pré-patente ou por alguns cães nunca soroconverterem (PARANHOS-SILVA *et al.*, 1996).

Silva *et al.* (2011) em um estudo com cães, utilizou o teste imunocromatográfico rápido DPP® (Dual Path Platform) para o diagnóstico da leishmaniose, obtendo valores de 93% de sensibilidade e 92% de especificidade, indicando que este método pode ser uma eficiente alternativa para o diagnóstico da LVC. Devido à sua facilidade de execução e às altas taxas de sensibilidade e especificidade, o Ministério da Saúde recomenda, desde 2011, o teste DPP® como exame de referência na triagem da LVC, em substituição ao ELISA anteriormente utilizado. Contudo, resultados positivos no DPP® devem ser confirmados por ELISA (NOTA TÉCNICA N° 01/2011) para posterior eutanásia dos cães positivos para LV.

De modo geral, a baixa sensibilidade do exame microscópico direto de aspirados de medula óssea, a ineficiência de testes sorológicos na diferenciação de casos ativos e de cura, e o fato do isolamento de *Leishmania sp.* em cultura ser um método trabalhoso e com baixa sensibilidade, compõem um panorama adverso ao diagnóstico laboratorial da LVC que, segundo alguns autores, pode ser superado com a aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) (PIARROUX *et al.*, 1993; HU *et al.*, 2000).

## 1.5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Kary B. Mullis, em 1983, descreveu uma técnica, que denominou reação em cadeia da polimerase (PCR), que apresenta como propósito a produção de múltiplas cópias de uma dada sequência-alvo de DNA através de sucessivos ciclos de variações de temperatura.

As técnicas baseadas na PCR apresentam alta especificidade e sensibilidade, e a capacidade de amplificar exponencialmente cópias de DNA a partir de pequena quantidade de material genético (MESQUITA *et al.*, 2001), podendo ser capaz de detectar até mesmo uma cópia da sequência-alvo de DNA (FURLANETO *et al.*, 2007).

Tem sido demonstrado que métodos moleculares baseados na PCR são importantes ferramentas para o diagnóstico de diferentes doenças infecciosas, dentre elas as leishmanioses (HARRIS *et al.*, 1998). Na detecção do DNA de *Leishmania* este método apresenta a vantagem de utilização de uma extensa variedade de amostras clínicas, como por exemplo,

aspirados de linfonodos (REALE et al., 1999; MANNA et al., 2004), sangue (REITHINGER et al., 2000; MANNA et al., 2004), medula óssea (REITHINGER et al., 2000), pele (ROURA et al. 1999), “swab” oral e conjuntival (LOMBARDO, 2012), e pelos (BELINCHÓN-LORENZZO, 2012).

Além disso, esta metodologia tem sido utilizada na discriminação de espécies de *Leishmania* infectando uma ampla série de vertebrados (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005; DE ANDRADE et al., 2006) e de hospedeiros invertebrados, tais como flebotomíneos e carrapatos (COUTINHO et al., 2005; PARVIZI et al., 2005), embora a transmissão através de carrapatos não tenha sido comprovada.

Por ser uma técnica baseada na detecção de DNA do agente infeccioso, a condição imunológica do animal não interfere no resultado do teste, podendo ser utilizado por isso em casos com desfecho inconclusivo por outras técnicas, ou ainda nos casos de anergia ou de reação cruzada em testes sorológicos (ASHFORD et al., 1995; LACHAUD et al., 2002; MOREIRA et al., 2007). No entanto, o custo elevado em comparação com testes sorológicos limita a sua utilização em larga escala como teste de triagem (GONTIJO E MELO, 2004).

Atualmente, a realização da PCR requer o uso de pequeno volume de material biológico para a sua realização (MESQUITA et al., 2001). Existem diversos relatos da utilização da PCR com diferentes tipos de materiais clínicos (MANNA et al., 2004), alvos moleculares (WEISS, 1995) e métodos de extração e purificação de DNA (MESQUITA et al., 2001).

A extração de DNA pode ser realizada a partir de tecido fresco, sangue e células em cultivo (HARRIS et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2005). Além disso, tecidos embebidos em parafina também podem fornecer amostra de DNA, embora sua extração necessite de protocolo diferenciado. Foram estão descritos diversos estudos baseados na análise genética através da técnica de PCR usando tais tecidos conservados em blocos de parafina (ISOLA et al., 1994; ROURA et al., 1999; REN et al., 2000). Entretanto, alguns autores alertam sobre efeitos indesejáveis ao DNA, e comprometimento da amplificação, quando as amostras são fixadas em soluções fortemente ácidas (GREER et al., 1994).

A PCR convencional é uma técnica qualitativa, ou seja, resulta apenas em resultados positivos ou negativos, diferente da PCR em tempo real (qPCR), que pode ser quantitativa e, dessa forma, além de fornecer resultado diagnóstico, permite a determinação do número de cópias da sequência-alvo de DNA no material analisado. As vantagens da qPCR sobre a PCR convencional são a alta sensibilidade e a ausência de processamento pós-PCR, o que diminui o risco de contaminação cruzada e agiliza a execução do exame apresentando alto rendimento.

Na qPCR, o produto amplificado pode ser identificado através de sondas fluorogênicas complementares à sequência-alvo, o que aumenta a especificidade da reação (HEID et al. 1996).

Uma vez que grande parte dos animais infectados não apresenta sinais clínicos, a qPCR poderia ser utilizada como uma ferramenta no diagnóstico e controle da LVC, possibilitando a diferenciação dos cães infectados e de cães com a doença ativa (FRANCINO et al. 2006). Além disso, foi demonstrado uma maior sensibilidade da qPCR em comparação com a PCR convencional, além de proporcionar o acompanhamento dos animais após a terapia (MOHAMMADIHA et al. 2013)

No entanto, a qualidade do DNA aplicado na PCR é um fator importante para a obtenção de resultados fidedignos. De modo geral, amostras de tecido congelado resultam em DNA extraído com melhor qualidade, enquanto amostras fixadas em formol e embebidas em parafina (FFPE) podem resultar em DNA extraído parcialmente degradado, ou ainda contendo impurezas (FERRER et al. 2007).

Autores demonstraram que amostras FFPE estocadas por mais de 20 anos e com baixa carga parasitária podem ser um fator preditivo para resultado falso-negativo e que ao longo dos anos o DNA sofre progressiva degradação (FRICKMANN et al. 2013). Além disso, devido ao processo de fixação, se observa redução da eficiência da PCR, e formação de amplicons pequenos (DIETRICH et al. 2013). Deve-se levar em consideração também, o tipo de fixador, pois alguns autores sugerem que o formaldeído, por exemplo, além de degradar o DNA, gera uma ligação cruzada entre proteínas e ácidos nucleicos (GILBERT et al. 2007).

Contudo, neste método de conservação, a amostra é acondicionada sem refrigeração, o que facilita a realização de trabalhos epidemiológicos, o transporte a partir de locais distantes e com pouca infraestrutura, além da possibilidade de estudos retrospectivos (LASKAY et al 1995). Por esse motivo, torna-se relevante a avaliação da acurácia da qPCR realizada com amostras de DNA obtidas a partir de amostras de pele íntegra congelada e parafinada para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Atualmente, as técnicas moleculares baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm demonstrado alta especificidade e sensibilidade, além da necessidade de um pequeno volume de material biológico para a sua realização. Existem diversos relatos da utilização da PCR com diferentes tipos de material clínico, alvos moleculares, métodos de conservação das amostras e de extração e purificação de DNA.

Alguns autores consideram a utilização de amostras congeladas mais vantajosa em relação às amostras fixadas em formol e embebidas em parafina (FFPE) para a realização da PCR. Entretanto muitos pesquisadores defendem a importância das amostras FFPE devido à facilidade de conservação, transporte, armazenamento e a possibilidade de realização de estudos retrospectivos. Além da redução no número de fragmentos de tecidos coletados de um mesmo animal, amostras FFPE podem ser utilizadas em diferentes testes diagnósticos. Por esse, motivo torna-se relevante avaliação da acurácia da PCR realizada em amostras de pele íntegra congelada e FFPE.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a acurácia da técnica de qPCR, comparando amostras de pele íntegra de cães congelada e FFPE, para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a sensibilidade e a especificidade da técnica de qPCR quando realizada com amostras de DNA obtidas de pele íntegra congelada e FFPE, utilizando como padrão de referência os testes histológicos e de cultura parasitológica em amostras pareadas;
- Avaliar o nível de concordância dos resultados obtidos com a realização da técnica de qPCR utilizando amostras de DNA derivadas de pele íntegra congelada e FFPE.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. DESENHO DO ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Trata-se de um estudo de validação, com amostra de conveniência, contemplando 50 fragmentos de pele íntegra fixada em formol e embebida em parafina (FFPE) e 50 fragmentos de pele íntegra conservados por congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , coletados dos mesmos cães e armazenadas no Serviço de Anatomia Patológica e no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (Lapclin-Dermzoo) do IPEC/Fiocruz-RJ, respectivamente, totalizando 100 amostras.

Essas amostras são derivadas de estudo anterior, realizado no ano 2009 com 50 cães provenientes da cidade de Belém-PA. Para análise, foram coletados três fragmentos da região escapular utilizando *punch* de três milímetros, sendo um armazenado por congelamento em tubo microtubo de 2 mL, outro fixado com formol a 10% tamponado e posteriormente embebido em parafina, e o último mantido em solução salina fisiológica acrescida de antibióticos para realização de isolamento parasitário em meio de cultura.

Na ocasião do estudo, os animais foram avaliados clinicamente e as amostras biológicas (fragmentos de pele íntegra) analisadas pelas técnicas de cultura parasitológica, imunohistoquímica (IHQ) e microscopia após coloração por hematoxilina-eosina (HE). A conjugação destas metodologias foi utilizada como padrão de referência diagnóstica, sendo o cão considerado doente quando pelo menos um dos testes foi positivo, e considerado sadio quando todos os testes foram negativos.

#### 4.1.1. Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo cães com idade igual ou superior a oito meses, residentes na área urbana da cidade de Belém/PA, cuja prevalência de LVC tenha se mostrado igual ou superior a 10%. Além disso, foram incluídos cães residentes na área de estudo, detectados por busca ativa, e cujo proprietário aceitou participar do estudo assinando o termo de consentimento livre e esclarecido, independentemente da presença de sinais clínicos da doença.

#### 4.1.2. Critérios de Exclusão

Foram excluídos cães idosos (com idade superior a oito anos), ou submetidos ao tratamento para LVC, ou com alguma disfunção fisiológica que inviabilizasse a utilização de sedativos por indicação do veterinário responsável, cães agressivos cujo manejo colocasse em risco a segurança de seu proprietário ou da equipe de campo, ou ainda cães residentes de áreas de difícil acesso.

#### 4.2. PADRÃO DE REFERÊNCIA DIAGNÓSTICA

Os resultados referentes aos testes do padrão de referência (cultura parasitológica, IHQ e HE) e sorologia são provenientes de um banco de dados criado em estudo anterior.

A técnica de cultura parasitológica utilizada foi descrita anteriormente por Silva *et al.* (2011), e nos casos em que se obteve isolamento parasitário, as amostras foram expandidas para a produção de massa parasitária para posterior caracterização isoenzimática (CUPOLILLO *et al.* 1994).

Os testes sorológicos (EIE, IFI e o teste imunocromatográfico rápido DPP®) foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

Para a IFI, utilizou-se o “kit” IFI-leishmaniose-Biomanguinhos (IFI-LC), que contém antígeno de formas promastigotas de *Leishmania major*-like (MHOM/BR/76/JOF) produzidos por Biomanguinhos/Fiocruz. Foram consideradas positivas as amostras de soro que apresentaram fluorescência nas diluições  $\geq$  a 1:40.

Para o EIE, foi utilizado o “kit” EIE-Canine Visceral Leishmaniasis (BioManguinhos/Fiocruz), que utiliza o mesmo extrato antigênico presente no “kit” de IFI. Amostras de soro foram diluídas a 1:40, em duplicata, e o ponto de corte foi estabelecido pela média das leituras dos controles negativos acrescida de duas vezes o desvio padrão dos mesmos. Dessa forma, a reatividade foi definida a partir do resultado da divisão da densidade óptica (DO) pelo ponto de corte.

Para o DPP, as amostras de soro foram avaliadas pelo teste produzido por Biomanguinhos/Fiocruz, que apresenta os antígenos recombinantes específicos de *L. (L.) infantum*. O teste foi considerado positivo, quando as bandas de teste e de controle interno se mostraram visíveis, ou negativo, quando apenas a banda referente ao controle interno foi

revelada. O teste foi considerado inválido quando da ausência de bandas, sendo neste caso repetido.

No caso da IHQ, os cortes histológicos obtidos a partir da clivagem dos blocos de parafina foram fixados em lâmina silanizada, sendo a marcação realizada de acordo com o protocolo descrito por Quintella et al. (2009). A positividade foi definida pela observação de pelo menos uma estrutura marcada em castanho e morfológicamente compatível com a forma de uma amastigota.

Na técnica de HE, os fragmentos foram fixados, desidratados e parafinados, e os cortes histológicos obtidos corados com hematoxilina-eosina para posterior observação em microscópio óptico. O diagnóstico foi considerado positivo quando foi possível a visualização do parasito nos tecidos analisados (CARSON E HLADICK, 2009).

### 4.3. REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE qPCR

Este trabalho utilizou em sua metodologia a Diretriz MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN et al. 2009), e todas as etapas da qPCR foram realizadas no Lapclin-Dermzoo (IPEC-Fiocruz).

#### **4.3.1. Preparo dos cortes histológicos, extração e purificação de DNA a partir de amostras parafinadas**

No serviço de Anatomia Patológica (IPEC-Fiocruz), amostras de pele íntegra FFPE foram processadas, sendo realizados cinco cortes histológicos de 5µm de espessura utilizando-se micrótomo (Leica Microsystems RM 2025). Para evitar a contaminação entre as amostras, o micrótomo foi higienizado com etanol a 70%, e teve a navalha descartável substituída por uma nova ao início do processamento de cada amostra.

Os cortes histológicos foram coletados com auxílio de pinças estéreis e transferidos diretamente para microtubos de 1,5 mL, previamente identificados, e que foram entregues em caixa de armazenamento em ordem numérica sem descrição do diagnóstico prévio do animal.

A desparafinização das amostras foi realizada com a adição de 1 mL de xilol, seguida de centrifugação a 13.000 rpm por dois minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de etanol a 100%. As amostras foram novamente centrifugadas a 13.000 rpm por dois minutos, e o sobrenadante descartado. Em seguida, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 1h para a evaporação do etanol.

Após a incubação, foi realizado o processo de extração de acordo com as recomendações do fabricante do “kit” comercial QIAamp® DNA FFPE Tissue (Qiagen, Califórnia, USA). Para tal, o sedimento foi ressuspendido em 180 µL de tampão de lise (ATL). Foram adicionados 20 µL de solução de proteinase K, sendo as amostras incubadas em banho-seco a 56°C por 1h, seguida de incubação a 90°C por mais 1h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 7.000 rpm por 1 minuto e adicionadas de 2 µL de RNase A, sendo incubadas a temperatura ambiente por dois minutos. Foram adicionados aos microtubos 200µL da solução de lise e 200µL de etanol 100%, que foram então homogeneizados durante 10 segundos. As amostras foram transferidas para colunas de purificação acopladas a tubos de coleta e submetidas à centrifugação a 8.000 rpm por 1 min. Os resíduos resultantes foram descartados, sendo em seguida adicionados 500 µL de tampão de lavagem (AW1) às colunas, que foram novamente centrifugadas a 8.000 rpm por 1 min. Nesta etapa, os resíduos foram descartados e realizada a adição de 500 µL de tampão de lavagem (AW2) às colunas, que foram homogeneizadas e submetidas à nova centrifugação. Após o descarte dos resíduos, as colunas foram transferidas para novos microtubos de 1,5ml, adicionadas de 50 µL de tampão de eluição (ATE) e, após cinco minutos de incubação, centrifugadas a 13.000 rpm por cinco minutos. O DNA extraído foi identificado com data do processamento e o código da extração, sendo mantidos a -20°C.

#### **4.3.2. Extração e purificação de DNA a partir de amostras congeladas**

Para a extração de DNA, a partir de amostras congeladas, foi utilizado o “kit” Illustra™ Tissue & Cells Genomicprep Mini spin (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. Inicialmente, as amostras de tecido foram transferidas para microtubos contendo 1 mL de salina fosfatada tamponada (PBS) e submetidas à centrifugação a 13.000 rotações por minuto (rpm) por dois minutos. Posteriormente, os sobrenadantes foram descartados e os fragmentos de tecido macerados manualmente com auxílio de um pistilo em aproximadamente 50 µL de PBS.

Após a maceração, as amostras foram adicionadas de 50 µL de solução de lise e de 10 µL de solução proteinase K, homogeneizadas durante 15 segundos, e em seguida incubadas em banho-seco a 56°C por 1 h. Após centrifugação a 7.000 rpm por 10 segundos, foram adicionados 5µ L de RNase A (20mg/mL), sendo as amostras incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 500 µL de solução de lise, e

após homogeneização por 15 segundos, as amostras foram mantidas em repouso, a temperatura ambiente, por 10 minutos. Ao final, as amostras foram transferidas para colunas de purificação acopladas a tubo coletor, e submetidas à centrifugação a 13.000 rpm por 1 min. Em seguida, os resíduos foram descartados, sendo adicionados 500 µL de solução de lise e realizada nova centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto. Os resíduos resultantes foram descartados, sendo realizada a adição de 500 µL de tampão de lavagem. Após homogeneização, foi repetida a centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto. As colunas foram transferidas para microtubos de 1,5mL, sendo adicionadas de 50 µL de tampão de eluição, e após 1 minuto de incubação foram centrifugadas a 13.000 rpm por 1 minuto. As amostras de DNA foram identificadas com a data do processamento e o código da extração e conservadas a -20°C.

#### **4.3.3. Quantificação de DNA por fluorimetria**

Esta técnica permite a quantificação de DNA utilizando corantes fluorescentes, que são detectados pela plataforma Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen®) quando utilizado o “kit” Qubit® dsDNA HS Assay, seguindo as instruções do fabricante.

Para a quantificação, inicialmente foram estabelecidas curvas de concentração de DNA utilizando os dois padrões do “kit”, sendo que um representou o menor ponto da curva (padrão 1) e o outro o maior (padrão 2). A solução de trabalho foi preparada em um microtubo, utilizando-se 199 µL de tampão Qubit e 1 µL de reagente Qubit para cada amostra. Para a preparação dos padrões da curva (padrão 1 e padrão 2) foram adicionados 190 µL da solução de trabalho e 10 µL do padrão 1 ou 2, respectivamente, sendo as preparações homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente por dois minutos. Para a quantificação das amostras, foram adicionados 199 µL da solução de trabalho e 1 µL da amostra de DNA a ser quantificada e incubada a temperatura ambiente por dois minutos. Após a leitura no fluorímetro, a concentração de DNA em nanogramas por microlitro (ng/µL) foi definida através da curva-padrão, sendo os valores registrados. O limite de detecção desta metodologia foi de 0,0005ng de DNA em 1 µl de diluente.

#### 4.4. PCR QUANTITATIVA (qPCR)

##### 4.4.1. Confeção de curva-padrão para a determinação do número de cópias do genoma de *L. infantum*

A quantificação de formas promastigotas de *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) (*sin. L. infantum*) utilizada para a curva padrão para a determinação número de cópias genômicas foi feita empregando uma cultura em fase exponencial do crescimento, utilizando o hemocítmetro de Neubauer. O hemocítmetro (ou câmara de Neubauer) é uma lâmina que contém duas subcâmaras com área conhecida para que se possa determinar a concentração de células numa amostra líquida. A subcâmara contém uma grade gravada no vidro com arranjos de quadrados de tamanhos diferentes, cuja área é conhecida (usualmente 0,1 mm<sup>2</sup>). É colocada uma lamínula sobre a área da subcâmara, a qual deve ficar fixa. Isso é feito aplicando uma pequena pressão nas extremidades da lamínula.

Inicialmente, a amostra (cerca de 20 mL de cultura) foi lavada duas vezes em salina acrescida de fosfatos (PBS, pH 7.2) e retirada uma pequena alíquota (100 ul) para diluição (1:100), utilizando o corante Trypan Blue a 0.01%. Com o auxílio de uma micropipeta, a amostra foi colocada na subcâmara, preenchendo todo o quadrículo da câmara. A quantificação foi realizada na área dos 4 quadrantes, usualmente utilizada para contagem de glóbulos brancos, observando as linhas limites dessa área. As células que tocam as linhas superiores e direitas do quadrado não devem ser contadas, as células na parte inferior esquerda devem ser contadas.

O número total de parasitos, expresso em mililitros (mL), foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de parasitos/mL} = \text{número total de parasitos} / 4 \times 10^4 \text{ (fator de correção da câmara de Neubauer)} \times \text{diluição utilizada (100)}$$

Após a contagem, o número de parasitos foi ajustado para  $1 \times 10^6$  e centrifugado (7000 rpm/10 minutos/4°C). O sedimento foi estocado á -20°C até o momento da extração do DNA.

Para a extração do DNA de culturas de *L. infantum* utilizando o “kit” DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. Foi realizada a centrifugação a 190 rpm por cinco minutos de uma amostra contendo um total de  $1 \times 10^6$  parasitos provenientes de cultura de *L. infantum*. O sedimento foi ressuspensado em 200 µL de PBS, adicionado de 20 µL de proteinase K e 200 µL do tampão AL, e em seguida homogeneizado.

Posteriormente, foram adicionados 200  $\mu$  L de etanol a 100% e realizada homogeneização. A amostra foi cuidadosamente transferida para uma coluna de purificação, sem atingir a borda, e submetida à centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto, sendo então a coluna transferida para um novo tubo de coleta (2 mL). Em seguida, foram adicionados 500  $\mu$ L de solução AW1 e realizada centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna foi então transferida para um novo tubo de coleta, adicionada de 500  $\mu$ L de solução AW2, e centrifugada a 14.000 rpm por três minutos. A coluna foi finalmente transferida para um microtubo de 1,5 mL, e adicionada de 200  $\mu$ L de tampão AE, e incubada por 1 minuto a temperatura ambiente. Após centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto, o microtubo contendo DNA purificado foi identificado e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Considerando-se que a metodologia de extração de DNA apresentou rendimento de 100%, a amostra de DNA resultante, referente a  $1 \times 10^6$  parasitos eluída em 200  $\mu$ L de tampão, apresentou uma concentração de 5.000 cópias equivalentes de genoma (gEq) de *L. infantum*/ $\mu$ L. No momento de montagem da placa de reação, foram realizadas diluições seriadas na base 10 desta amostra de DNA. Cada ponto da curva foi realizado em triplicata, utilizando-se 5  $\mu$ L de cada diluição. Foram utilizadas as diluições referentes a 500, 50, 5, 0,5 e 0,05 gEq de *L. infantum*/ $\mu$ L, que representam os pontos de 2.500, 250, 25, 2,5, 0,25 gEq de *L. infantum*/reação de qPCR.

A curva-padrão relaciona-se às concentrações conhecidas de DNA, presentes em cada reação, com o ciclo em que a reação se tornou positiva, ou seja, quando o sinal de fluorescência referente à amplificação da sequência-alvo de DNA ultrapassa o limiar basal, definido pelo *threshold*. Dessa forma, através de uma curva de regressão linear definida com diferentes pontos com concentrações pré-determinadas de DNA, é efetuada a quantificação do número de cópias do DNA alvo nas amostras em teste.

#### **4.4.2. Protocolo de amplificação de DNA por PCR em tempo real**

Após a extração, as amostras de DNA foram submetidas à amplificação por PCR em tempo real, utilizando-se a plataforma StepOne™ (Applied Biosystems®) e sondas de hidrólise TaqMan®, sendo cada amostra testada em triplicata.

A sonda de hidrólise (TaqMan® MGB) e os iniciadores foram desenhados para reconhecer as regiões conservadas do kDNA de *L. infantum*. Os iniciadores LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3') e a

sonda (FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-NFQ-MGB) utilizados neste estudo foram descritos anteriormente no protocolo de Francino et al. (2006).

As reações foram realizadas num volume final de 25  $\mu\text{L}$ , sendo 5  $\mu\text{L}$  de amostra e 20  $\mu\text{L}$  da mistura de reação, que continha 12,5  $\mu\text{L}$  do reagente Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), 1,5  $\mu\text{L}$  dos iniciadores LEISH-1 e LEISH-2 a 900nM, 2,5  $\mu\text{L}$  da sonda a 200nM e 2  $\mu\text{L}$  de soro albumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich®) numa concentração de 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

As reações foram realizadas em placa de 48 poços (Applied Biosystems), que foi vedada com filme adesivo (Applied Biosystems) após a pipetagem da reação, utilizando o seguinte protocolo de amplificação: 1 ciclo de 50°C por 2 minutos, 1 ciclo de desnaturação a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e de anelamento/extensão a 60°C por 1 min.

Em cada placa de amplificação foram utilizados controles positivos e negativos e o limiar basal de fluorescência para determinação do ciclo de quantificação (Cq) ou *threshold* fixado em 0,1. O ponto de corte para a definição dos resultados detectáveis foi fixado em 37 ciclos, e amostras com Cq superior a 37 foram consideradas indetectáveis. O limite de detecção estabelecido a partir de repetições da curva-padrão com diluições seriadas foi de 0,0025 gEq de *L. infantum*/reação.

#### **4.4.3. Teste da qualidade do DNA**

A fim de identificar resultados falsos-negativos possivelmente causados pela presença de inibidores na reação ou de amostra de DNA degradado, um teste foi realizado em todas as amostras indetectáveis pela qPCR. Foi utilizado o ensaio Taqman® Gene Expression Assay system (Applied Biosystems, Foster City, CA), que contém par de iniciadores e sonda pré-definidos para a realização da qPCR para a amplificação de um segmento do gene constitutivo canino que codifica para a subunidade proteica  $\beta$ -actina (Cf03023880\_g1), num volume final de reação de 25  $\mu\text{L}$ , contendo 2  $\mu\text{L}$  de DNA e 23  $\mu\text{L}$  de mistura de reação composta de 12,5  $\mu\text{L}$  de Universal Mastermix, 1,25  $\mu\text{L}$  da solução de iniciadores e sonda e 9,25  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. Nesta etapa o resultado foi qualitativo, sendo considerado detectável ou indetectável. As amostras de DNA que apresentaram amplificação foram consideradas positivas e, por isso contendo DNA íntegro, e livre de inibidores.

#### 4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram organizados em um banco de dados e processados com auxílio do *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 16.0.

Os valores de sensibilidade, especificidade e os intervalos de confiança dos testes foram calculados utilizando-se como padrão de referência a conjunção dos resultados dos exames de cultura parasitológica, HE e IHQ com o auxílio do programa Microsoft Office Excel 2003.

Os resultados foram comparados em tabelas de contingência 2x2, e o grau de concordância dos resultados entre as amostras pareadas conservadas por congelamento ou por FFPE foi determinado pelo coeficiente de *Kappa*. O grau de concordância foi classificado segundo Shrout (1998):  $k = 0,00$  a  $0,10$  virtualmente ausente;  $k = 0,11$  a  $0,40$  fraco;  $k = 0,41$  a  $0,60$  discreto;  $k = 0,61$  a  $0,80$  moderado e  $k = 0,81$  a  $1,0$  substancial. Além disso, foram considerados significativos resultados do teste estatístico McNemar com  $p$ -valor  $< 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

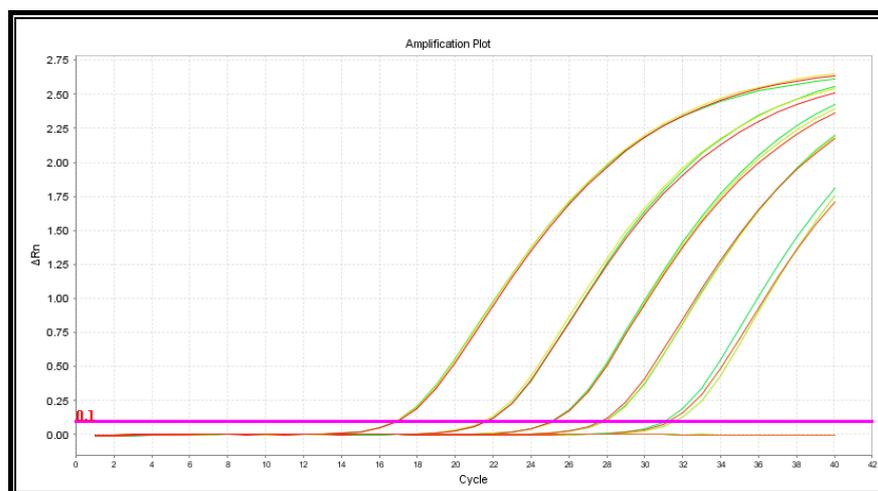
### 5.1. RESULTADOS DO PADRÃO DE REFERÊNCIA DA POPULAÇÃO DE CÃES INCLUÍDOS NO ESTUDO

Dos 50 cães incluídos no estudo, 11 (22%) apresentaram resultado positivo em pelo menos uma das três técnicas utilizadas como padrão referência diagnóstica da LVC (cultura parasitológica, HE ou IHQ). Ao todo, foram analisadas 49 amostras de pele íntegra congelada e 47 de pele íntegra FFPE. Uma amostra de pele íntegra congelada e três de pele íntegra FFPE foram excluídas por não apresentarem material suficiente para o processamento.

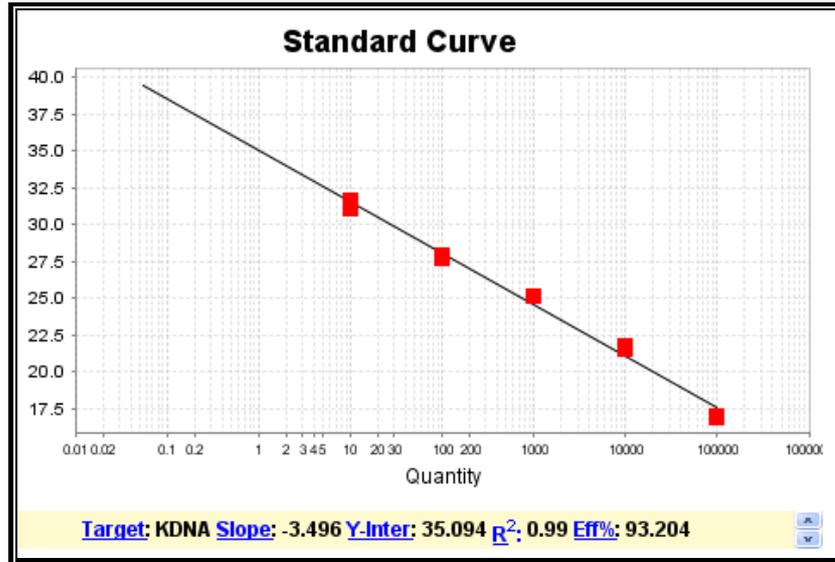
### 5.2. AVALIAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL PARA *L. infantum*

Para determinar o número de cópias equivalentes do genoma (gEq) de *L. infantum* em amostras de DNA de pele íntegra de cães, foram estabelecidas curvas-padrão a cada placa de reação. Através da análise das curvas-padrão obtidas foi verificada uma eficiência média da qPCR de 86,756% (Min: 83,494% e Max: 93,204%), referente à média de *slope* de -3,63 (Min: -3,4 e Max: -3,7), e média Y-intercepto de  $C_q = 35,399$  (Min: 35,094 e máx:35,857), com média de ajuste dos valores à curva ( $R^2$ ) de 0,99 (Figura 1).

(A)



(B)



**Figura 1.** Gráfico representativo da curva-padrão (A) utilizada para quantificação de *L. Infantum* a partir da amplificação de região do kDNA, com *threshold*, indicado pela linha rosa, fixado em 0,1. Os valores dos ciclos de quantificação (Cq) estão apresentados em (B), em que os pontos da curva indicam a diluição seriada na base 10 de 500 a 0,05 gEq de *L. infantum*/μL. Os índices Slope, Y-inter, R<sup>2</sup> e eficiência da qPCR estão apresentados.

### 5.3. QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE DNA OBTIDAS

A qualidade das amostras de DNA derivadas de amostras de pele congelada e FFPE, quanto à presença de DNA amplificável ou de inibidores da PCR, foi determinada através da amplificação de um fragmento do gene para a β-actina canina. De um total de 47 amostras provenientes de tecido FFPE, seis (12%) não apresentaram amplificação, indicando a presença de inibidores da qPCR ou de DNA amplamente degradado. Por outro lado, todas as 48 amostras testadas derivadas de tecido congelado apresentaram amplificação do gene para β-actina, e apenas uma amostra não foi testada devido ao volume insuficiente de material.

Na tabela 1 estão apresentados os resultados da quantificação de DNA por fluorimetria. A mediana da concentração de DNA nas amostras de pele FFPE (0,15 ng/μL) se mostrou significativamente inferior ( $p < 0,05$ , Shapiro-Wilk) ao observado nas amostras de tecido congelado (7,90 ng/μL), sendo observada uma grande variação entre os valores mínimos e máximos obtidos de concentração de DNA, principalmente nas amostras provenientes de pele congelada (Tabela 1).

**TABELA 1. Quantificação de DNA de tecido congelado e FFPE (ng/ $\mu$ L).**

<b>Amostras de pele íntegra</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil (25%-75%)</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
FFPE	0,1540	0,0005 – 0,3900	0,0005	1,5400
Congelada	7,9200*	2,5700 – 21,9000	0,0005	77,7000

**NOTA.** FFPE, fixado com formol e embebido em parafina. Os valores de concentração de DNA estão apresentados em ng/ $\mu$ L. \* Comparação dos valores de mediana de concentração de DNA de tecido congelado e FFPE por Shapiro-Wilk,  $p < 0,05$ .

#### 5.4. AVALIAÇÃO DA qPCR UTILIZANDO AMOSTRAS DE DNA DE TECIDO CONGELADO

Os resultados obtidos na qPCR utilizando amostras de DNA derivadas de pele íntegra congelada, em comparação com os resultados do padrão de referência, estão apresentado na tabela 2. De um total de 48 amostras, 28 apresentaram resultados concordantes (11 positivas e 17 negativas) e 20 foram discordantes, sendo estas últimas todas pertencentes ao grupo negativo de acordo com o padrão de referência utilizado.

**TABELA 2. Comparação entre os resultados da qPCR e do padrão de referência utilizando amostras de tecido congelado.**

		<b>Padrão de Referência (Cultura/HE/IHQ)</b>		
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
<b>Resultado da qPCR</b>	<b>Detectável</b>	11	20	31
	<b>Indetectável</b>	0	17	17
<b>Total</b>		11	37	48

**NOTA.** Padrão de referência: Cultura parasitológica, Histologia pela coloração de hematoxilina-eosina (HE) e imunohistoquímica (IHQ). qPCR: PCR em tempo real.

### 5.5. AVALIAÇÃO DA qPCR UTILIZANDO AMOSTRAS DE DNA DE TECIDO FFPE.

Os resultados obtidos na qPCR, na comparação entre o padrão de referência e as amostras de tecido FFPE, estão apresentados na tabela 3. De um total de 47 amostras FFPE, 35 apresentaram resultados concordantes (7 positivas e 28 negativas), enquanto 12 apresentaram resultados discordantes (4 positivas e 8 negativas).

**TABELA 3. Comparação dos resultados da qPCR entre o padrão de referência e as amostras de tecido FFPE.**

		Padrão de Referência (cultura/HE/IHQ)		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado qPCR	Detectável	7	8	15
	Indetectável	4	28	32
Total		11	36	47

**NOTA.** Padrão de referência: Cultura parasitológica, Histologia pela coloração de hematoxilina-eosina (HE) e imunohistoquímica (IHQ). qPCR: PCR em tempo real.

### 5.6. COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DA qPCR UTILIZANDO AMOSTRAS DE DNA DE TECIDO CONGELADO E FFPE.

Os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativo e positivo da qPCR foram calculados utilizando os resultados obtidos com amostras de pele íntegra congelada ou FFPE, e estão apresentados na tabela 4. Considerando os dados obtidos com amostras de tecido congelado, a sensibilidade se mostrou elevada (100%), enquanto a especificidade se mostrou baixa (45,9%). Utilizando amostras de tecido FFPE, tanto a sensibilidade (63,7%) quanto à especificidade (77,8%) se mostraram satisfatórias.

**TABELA 4. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da qPCR utilizando amostras de DNA de pele congelada e FFPE.**

Amostras de pele íntegra	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
FFPE	63,7% (30,8% - 89,1%)	77,8% (60,9% - 89,9%)	46,7%	87,5%
Congelada	100% (71,5% - 100%)	45,9% (29,5% - 63,1%)	35,5%	100%

**NOTA:** FFPE: amostra de tecido fixada em formol e embebida em parafina. VPP: valor preditivo positivo. VPN: valor preditivo negativo.

Dos resultados obtidos da comparação entre amostras de pele congelada e FFPE através da qPCR, de um total de 46 amostras, 24 apresentaram resultados concordantes (11 detectável e 13 indetectável), enquanto 22 amostras foram discordantes (Tabela 5). O índice de concordância dos resultados da qPCR utilizando amostras de tecido congelado e FFPE foi avaliado através do índice *Kappa*, que apresentou grau 0,12. De acordo com Shrout (1998), este grau de concordância é considerado fraco. Este baixo grau de concordância entre os resultados da qPCR é corroborado pela comparação dos dados utilizando o teste de McNemar ( $p= 0,004$ ), indicando que o método de conservação/extração da amostra interfere no resultado da qPCR.

**TABELA 5. Comparação entre os resultados da qPCR utilizando amostras de tecido congelado e FFPE.**

		Resultado qPCR tecido congelado		
		Detectável	Indetectável	Total
Resultado qPCR tecido FFPE	Detectável	11	4	15
	Indetectável	18	13	31
Total		29	17	46

**NOTA.** FFPE: amostra de tecido fixada em formol e embebida em parafina. qPCR: PCR em tempo real.

Analisando os valores das medianas do número de cópias de equivalente genômico (gEq) de *L. infantum* nas amostras que apresentaram resultados discordantes entre a qPCR e o padrão de referência, tanto em amostras congeladas quanto FFPE (Tabela 6), foi observado que a mediana de gEq/ng de DNA nas amostras de tecido congelado foi aproximadamente 67 vezes maior no grupo que apresentou resultado positivo no padrão de referência em comparação com as amostras negativas, indicando que a obtenção de resultados positivos no padrão de referência requer níveis de carga parasitária superiores ao mínimo necessário para detecção pela qPCR. No entanto, esta diferença não foi observada nas amostras derivadas de tecido FFPE.

**TABELA 6. Mediana da carga parasitária de *L. infantum*/ng de DNA de tecido congelado e de FFPE determinada através da qPCR.**

Amostras de pele íntegra	(+) qPCR	(+) qPCR
	(-) padrão de referência	(+) padrão de referência
FFPE	3,193	0,090
Congelado	0,003	0,202

**NOTA:** FFPE: amostra de tecido fixada em formol e embebida em parafina. qPCR: PCR quantitativa. Padrão de referência: Cultura parasitológica, Histologia pela coloração de hematoxilina-eosina (HE) e imunohistoquímica (IHQ). Valores apresentados em número de cópias do genoma de *L. infantum*/ng de DNA.

A partir dos resultados de sorologia (IFI, ELISA e DPP) obtidos do banco de dados, dos animais que tiveram resultados discordantes entre o padrão de referência e a qPCR, foram recalculadas a sensibilidade e especificidade das amostras (tabela 7). Foi observado o aumento dos valores de sensibilidade e especificidade, nos dois tipos de amostras.

**Tabela 7: Resultado das amostras discordantes entre padrão de referência e qPCR comparados com a sorologia**

Amostras de pele íntegra	(-) Padrão de referência (+) qPCR	(+) sorologia	Sensibilidade	Especificidade
FFPE	8	6	76,5%	93,3%
Congelada	20	14	100 %	73,9%

**NOTA.** FFPE: amostra de tecido fixada em formol e embebida em parafina. qPCR: PCR em tempo real.

## 6.0 DISCUSSÃO

Neste estudo, fragmentos de pele íntegra foram usados como amostra biológica para o diagnóstico da LVC através da qPCR específica para uma sequência do kDNA de *L. infantum*. A pele tem se mostrado um excelente sítio para confirmação parasitológica (MADEIRA et al. 2009), e é um importante indicador, já que a transmissão desta infecção se dá durante o repasto sanguíneo do inseto vetor. Dessa forma, quanto maior o número de parasitas na pele maior a probabilidade de infecção do vetor. Além disso, o material coletado do mesmo sítio na pele pode ser utilizado para os três exames do padrão de referência (cultura parasitológica, HE e IHQ), sem a necessidade de aumentar o número de espécimes biológicos.

A qPCR é uma técnica sensível e de grande utilidade para detecção de agentes infecciosos. A taxa de eficiência de amplificação ideal é de 100%, ou seja, que todas as cópias da sequência-alvo sejam duplicadas a cada ciclo de amplificação. Contudo, diversos fatores influenciam neste processo, tais como: técnica de pipetagem, condições de reação, percentual de GC da sequência-alvo, dentre outros. A qPCR utilizada neste estudo apresentou boa taxa de eficiência (média 86,76%), embora o *slope*, que está diretamente relacionado com a eficiência da reação, tenha sido menor (-3,63) do que o ideal (-3,3).

Outro potencial interferente com a eficiência da qPCR é a qualidade das amostras de DNA, que devem estar livres de proteínas e outros possíveis inibidores da reação de amplificação de ácidos nucleicos, e que contenham moléculas de alto peso molecular, o que representa um indicador de integridade do DNA. Quando a extração de DNA foi realizada a partir de amostras de tecido congelado, foi possível obter amostras com maior concentração média de DNA em comparação com aquelas derivadas de tecido FFPE. Um dos fatores limitantes da recuperação de DNA a partir de tecidos FFPE é o tempo de fixação em formol tamponado a 10% para posterior parafinização. Em nosso estudo, o tempo médio deste procedimento foi de 10 dias. Na literatura, estudos demonstram que fixadores ácidos interferem na qualidade dos ácidos nucleicos, contribuindo para a degradação do DNA (BENZERA et al. 1990; GREER, et al. 1991), e que amostras fixadas e armazenadas por mais de seis meses apresentam resultado insatisfatório na PCR devido a degradação de DNA (FERRER et al. 2007).

Outro procedimento que também deve ser levado em consideração como fator de interferência com a qualidade das amostras de DNA derivadas de tecidos FFPE é o processo de desparafinização anterior à extração de DNA, em que a amostra é tratada com etanol e xilol, que são potenciais inibidores da qPCR. Além disso, as diferentes etapas da extração

podem provocar a fragmentação e perda de DNA. Vilanova-Costa et al. (2008) obtiveram amostras de DNA de fragmentos de mama e orofaringe FFPE de humanos com concentração de 14 a 68ng/ $\mu$ L, enquanto Paniagua (2013) obteve uma média de 18,91ng/ $\mu$ L utilizando amostras de biópsias de vesícula biliar de humanos. No entanto, a recuperação de DNA em baixas concentrações em nosso estudo está provavelmente relacionada com o volume de amostra usado para a extração.

De fato, um dos maiores desafios encontrados neste estudo foi a baixa concentração de DNA proveniente das amostras FFPE, o que inviabilizou a utilização de uma concentração única e pré-definida de DNA nos ensaios de qPCR para as diferentes amostras. Desta forma, utilizamos 5  $\mu$ L de cada amostra de DNA por reação, independentemente da sua concentração, que foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos foram normalizados posteriormente, utilizando-se a massa de DNA presente nos 5  $\mu$ L de amostra como denominador. Por esse motivo, é possível que a sensibilidade e a especificidade da qPCR calculadas a partir dos resultados com estas amostras possam ter sido comprometidas, pois quanto menor a massa de DNA presente na reação, menor a chance de detecção da sequência-alvo de DNA.

Para sobrepor tais limitações e aumentar a sensibilidade da técnica de PCR para detecção do genoma de parasitos em amostras embebidas em parafina, tem sido sugerida a utilização de um número maior de seções de tecido FFPE para a extração de DNA, visto que o número de parasitos por seção é pequeno (ROURA et al. 1999). Neste estudo, utilizamos para a extração de DNA cinco cortes de 5  $\mu$ m de espessura de amostras de pele íntegra FFPE, enquanto as amostras de tecido congelado foram derivadas de perfurações da pele com 3 mm de diâmetro. Uma vez que as amostras de DNA obtidas foram eluídas em 50  $\mu$ L de tampão, em ambos os casos, diferenças entre a massa de tecido congelado e FFPE submetidos à extração de DNA podem ter influenciado na grande diferença das médias de concentração final de DNA obtidas a partir destas duas fontes de material.

O rendimento da técnica de extração de DNA também está relacionado com o método utilizado (FERNANDES et al. 2004). Em nosso estudo não avaliamos o rendimento das técnicas utilizadas para extração de DNA. Porém, procuramos utilizar metodologias e reagentes adequados a cada tipo de amostra biológica. No entanto, devido à baixa concentração de DNA em algumas amostras, não foi possível realizar a repetição de algumas análises, principalmente daquelas que apresentaram um alto desvio-padrão nas triplicatas, provavelmente em decorrência da própria concentração reduzida de DNA.

Dietrich *et al.*(2013) demonstraram que dificuldades na amplificação do DNA pela PCR também podem estar relacionadas à presença de inibidores da DNA polimerase e ao pequeno número inicial de moléculas contendo sequências-alvo com integridade suficiente para a amplificação. Contudo, o processo de inibição da PCR pode ser revertido com adaptações da técnica.

Considerando a acurácia da qPCR para a detecção de *L. infantum*, a sensibilidade da técnica utilizando amostras de tecido congelado se mostrou excelente (100%), enquanto a especificidade apresentou valor baixo (45,9%). Na literatura estão descritos alguns resultados utilizando a PCR convencional, Piarroux (1994) obteve sensibilidade superior a 82% e especificidade de 97% com aspirado de medula óssea em pacientes imunocomprometidos. Igualmente, Xavier *et al.* (2006) apresentaram sensibilidade de 82,8% na PCR convencional, enquanto Quinnel (2009) relatou que os valores de sensibilidade do teste podem variar de acordo com o tempo de infecção, atingindo valores de 78 a 88%, 135 dias após a infecção.

Contudo, a baixa especificidade apresentada pela qPCR descrita em nosso estudo pode ser resultado das baixas taxas de sensibilidade apresentadas pelas metodologias utilizadas para compor o padrão de referência diagnóstica, como por exemplo as taxas de sensibilidade de 62,1% para a IHQ e 44,8% para HE (XAVIER *et al.* 2006). No caso da cultura parasitológica, embora a especificidade seja elevada, a sensibilidade é variável, pois a distribuição dos parasitas na pele não se apresenta de modo uniforme (GONTIJO e MELO, 2004).

A qPCR apresenta alta sensibilidade, sendo capaz de detectar o DNA de *Leishmania* em animais que apresentam carga parasitária abaixo do limite necessário para a sua observação pelas técnicas de cultura, HE, e IHQ, conforme demonstrado por nossos resultados. As medianas de quantificação de equivalentes genômicos (carga parasitária) sugerem que mesmo com níveis reduzidos de carga parasitária nas amostras (0,002 a 3,19 gEq/ng de DNA) a qPCR apresenta sensibilidade suficiente para revelar a presença de infecção.

Corroborando essa teoria de que o padrão de referência possui baixa sensibilidade, observamos que as amostras discordantes entre a qPCR (+) e o padrão de referencia (-), 20 amostras (6 FFPE e 14 congeladas) foram reagentes em algum exame sorológico (ELISA, IFI e DPP).

A partir dos dados de sorologia apresentados, foram recalculados os valores de sensibilidade e especificidade e foi observado o aumento dos valores de sensibilidade e especificidade, nos dois tipos de amostras. Além disso, a qPCR com amostras congeladas continuou apresentando sensibilidade (100%) superior à utilização de tecido FFPE (76,5%),

enquanto a qPCR com amostras de DNA provenientes de tecido FFPE se mostrou mais específica (93,3%) em comparação com as amostras congeladas (73,9%).

Por outro lado, de quatro amostras de tecido FFPE que apresentaram resultado indetectável na qPCR e foram positivas no padrão de referência, todas se mostraram reagentes em algum exame sorológico. Contudo, as quantidades de DNA contidas nestas amostras foram muito baixas, variando de 0,0005 a 1,5ng/ $\mu$ L, sugerindo que os resultados indetectáveis na qPCR podem estar relacionados à baixa concentração de DNA nas amostras obtidas.

Na comparação do resultado da qPCR entre as amostras de tecido congelado e FFPE, 22 amostras foram discordantes, destas 18 foram detectáveis no tecido congelado, mas indetectáveis na de tecido FFPE, indicando a alta sensibilidade da qPCR nessas amostras. E quatro amostras de tecido FFPE foram detectáveis na qPCR e indetectáveis no tecido congelado, o que pode ser resultado da distribuição heterogênea dos parasitas na pele ou devido ao excesso de DNA do hospedeiro.

A sensibilidade reduzida da qPCR com a utilização de amostras FFPE indicam que a detecção de parasitos através deste sistema necessita de maior carga parasitária, quando comparada com amostras de tecido congelado. Frickmann et al. (2013) relataram que o longo tempo de estoque de amostras FFPE (mais de 20 anos) e a baixa carga parasitária podem ser fatores preditivos para resultados falso-negativos.

Neste estudo, seis amostras FFPE apresentaram resultado indetectável no teste de qualidade do DNA (qPCR para  $\beta$ -actina). Contudo, em todos os casos não havia volume de amostra suficiente para análises subsequentes. Além disso, ao avaliar a concentração de DNA dessas amostras, a mediana foi 0,16ng/ $\mu$ L (quantificação pela fluorimetria). Com isso, a junção dos fatores pouco volume e baixa concentração de DNA pode ter influenciado a não detecção de parasitos nestas amostras.

Ferrer et al. (2007) demonstraram que o congelamento é o método de conservação mais adequado para a formação de bancos de amostras cerebrais considerando a recuperação de DNA. Em nosso estudo, confirmamos que o congelamento de amostras de pele apresenta vantagens para a recuperação e amplificação de DNA, embora a qPCR utilizando amostras FFPE tenha apresentado valores semelhantes de sensibilidade e especificidade. A LVC ocorre em regiões de condições precárias e de difícil acesso, inviabilizando ou dificultando o diagnóstico. Embora a qPCR ainda seja uma técnica com custo elevado e necessite de pessoal qualificado, a utilização de amostras FFPE se justifica, devido a sua facilidade de transporte e armazenamento, além da redução do número de amostras coletadas dos animais.

## 7. CONCLUSÕES

- A sensibilidade da qPCR utilizando amostras de pele congelada foi elevada, embora a especificidade tenha se mostrado baixa.
- Na qPCR com amostras de tecido FFPE, a sensibilidade e especificidade se mostraram satisfatórias.
- A concordância dos resultados da técnica de qPCR com amostras congeladas e FFPE foi fraca, provavelmente como um reflexo da diferença da qualidade e quantidade do DNA obtido.
- A recuperação/concentração de DNA nas amostras FFPE foi baixa, mas os resultados obtidos indicam sensibilidade e especificidade moderados, demonstrando que é possível o diagnóstico da leishmaniose visceral canina com amostras FFPE.
- A qPCR pode auxiliar no diagnóstico da LVC, pois se mostrou com alta sensibilidade, suprimindo a deficiência de outras técnicas que necessitam do parasita íntegro/viável ou do estado imunológico do animal no momento da coleta.

## REFERÊNCIAS

Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol.* 2005;127(3-4):227-232.

Alves WA, Bevilacqua PD. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad Saúde Publ.* 2004;20(1):259-65.

Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulalio C et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;53(3):251-5.

Belinchón-Lorenzo S, Iniesta V, Parejo JC, Fernández-Cotrino J, Muñoz-Madrid R, Soto M, Alonso C, Gómez Nieto LC. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2012;Feb 18;192(1-3):43-50.

Ben-ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of Fixation on the Amplification of Nucleic Acids from Paraffin-embedded Material by the Polymerase Chain Reaction. *J Histochem Cytochem* 1991;39(3)351-354.

Brandao-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97(3):291-6.

Brewster S, Aslett M and Barker DC. Kinetoplast DNA Minicircle Database. *Parasitology Today* 1998; 14(11).

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55:611–22.

Carson FL, Hladick C. *Histotechnology: a self instructional text*, 3rd ed. Chicago, IL: ASCP Press, 2009.

Coutinho MT, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2005;128(1-2):149-55.

Cupolillo E, Grimaldi JG, Momen H. A general classification of new world *Leishmania* using numeral zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994;50: 296–311.

De Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol.* 2006;140(3-4):231-8.

Deane LM, Deane MP. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Geographical Distribution and Transmission. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1962;4:198-212.

Deane LM, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hospital*. 1955;47(1):75-87.

Dietrich D, Uhl B, Sailer V, Holmes EE, Jung M, et al. Improved PCR Performance Using Template DNA from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues by Overcoming PCR Inhibition. *PLoS ONE* 2013;8(10).

Fernandes JV, Meissner RV, Fernandes TAAM, Rocha LRM, Cabral MC, Villa LL. Comparação de três protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2004; 40(3).

Ferrer I, Armstrong J, Capellari S, Parchi P, Arzberger T, Bell J, Budka H, Ströbel T, Giaccone G, Rossi G, Bogdanovic N, Fakai P, Schmitt A, Riederers P, Sarraj A, Ravid R, Kretschmar H. Effects of Formalin Fixation, Paraffin Embedding, and Time of Storage on DNA Preservation in Brain Tissue: A BrainNet Europe Study. *Brain Pathol.* 2007;17:297–303.

França-Silva JC, Barata RA, Costa RT, Monteiro EM, Machado-Coelho GL, Vieira EP et al. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol.* 2005;131(3-4):213-220.

Francino O, Altet L, Sa´nchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sa´nchez A, Roura X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis *Vet Parasitol.* 2006;137:214–221.

Frickmann H, Tenner-Racz K, Eggert P, Schwarz NG, Poppert S, Tannich E, Hagen RM. Influence of parasite density and sample storage time on the reliability of *Entamoeba histolytica*-specific PCR from formalin-fixed and paraffin embedded tissues. *Diagn Mol Pathol.* 2013 Dec;22(4):236-44.

Furlaneto IP, Sousa EB, Brito ML, Lima GLF, Lopes ML, Silva SHM et al. Avaliação de diferentes procedimentos para extração de DNA a partir de esfregaços corados pelo método de Ziehl-Neelsen. *Cad. Saúde Colet.* 2007;15(3):401-404.

Galati EA, Nunes VL, Rego Junior Fde A, Oshiro ET, Chang MR. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Saude Publica.* 1997;31(4):378-90.

Galimbertti MZ, Katz G, Rodas LAC, Casanova C, Costa AI. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;1:217.

Gilbert MTP, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, et al () The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues– Which Methods Are Useful When?. *PLoS ONE.* 2007;2(6).

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bra Epidemiol. 2004;7(3):338-349.

Greer CE, Lund JK, Manos MM. PCR Amplification from Paraffin-embedded Tissues: Recommendations on Fixatives for Long-term Storage and Prospective Studies. Genome Res. 1991;1: 46-50

Greer CE, Wheeler CM, Manos MM. Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Genome Res. 1994;3:113-122.

Grimaldi G, Tesh Jr. RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin Microbiol Rev. 1993;6(3):230-50.

Grimaldi, G, Tesh Jr, Ferreira AL, Santos CB, Pinto IS, Azevedo CT, Falqueto A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPPR CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012;106:54-59.

Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. J Clin Microbiol. 1998;36(7):1989-95.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996;6: 986-994

Hu XS, Yang WT, Lu HG, Yan HP, Cheng JP, Ma Y et al. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. J Parasitol 2000;86(4):822-6.

Ikeda-Garcia FA, Feitosa MM. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Rev Clin Vet. 2006;62:32-38.

Imam TS. The complexities in the classification of protozoa: a challenge to parasitologists. Bajopas. 2009;2 (2).

Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. Am J Pathol 1994;145:1301-1308.

Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, Oddone R, et al. Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5(6).

Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP *et al.* Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. Parasitol. 2002;125(Pt 3):197-207.

Laskay T, Mikó TL, Negesse Y, Solbach W, Rollinghoff M, Frommel D. Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. T Roy Soc Trop Med H. 1995; 89: 273-275.

Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Migliazzo A, Capri A, Solano-Gallego L. Detection of *leishmania infantum* in DNA by real time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with others diagnostics techniques. *Vet Parasitol.* 2012;18:410-17.

Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(4):566-7.

Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE: Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2004; 125:251-62.

Madeira MF, Sousa MA, Barros JH, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A, DE Paula CC, Faissal BN, Fonseca TS, Thoma HK, Marzochi MC. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil *Parasitology.* 2009; 136: 411–423.

Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica* 1994a;10 Suppl 2:359-75.

Marzochi MC, Coutinho SG, De Souza WJ, De Toledo LM, Grimaldi Junior G, Momen H et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1985;80(3):349-57.

Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica.* 1994b;10 Suppl 2:359-75.

Marzochi MCA, Marzochi KBF. Leishmanioses em áreas urbanas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997;30:162-167.

Mesquita RA, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesqui Odontol Bras* 2001;15(4):314-319.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde - MS (ed), Brasília. 2006:122.

Mohammadiha A, Haghghi A, Mohebbali M, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, Yeganeh F, Kazemi B, Taghipour N, Akhouni B, Barati M, Mahmoudi MR. Canine visceral leishmaniasis: A comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. *Vet Parasitol.* 2013; 192:83– 90.

Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol.* 2007;145(3-4):245-52.

Nota técnica conjunta nº 01/2011b- CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

Nunes VL, Galati EA, Nunes DB, Zinezzi RO, Savani ES, Ishikawa E et al. Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34(3):299-300.

Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol*. 2005;129(3-4):219-27.

Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, Franca-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(5):510-7.

Paniagua JÁ. Busca de mutações no gene *KRAS* em amostras de carcinoma de vesícula biliar. 2013. 93f. Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia - Universidade Católica de Brasília.

Paranhos-Silva M, Freitas LA, Santos WC, Grimaldi GJ, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveirados-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55(1):39-44.

Parvizi P, Mauricio I, Aransay AM, Miles MA, Ready PD. First detection of *Leishmania major* in peridomestic *Phlebotomus papatasi* from Isfahan province, Iran: comparison of nested PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of minicircle kinetoplast DNA. *Acta Trop*. 2005;93(1):75-83.

Piarroux R, Azaiez R, Lossi AM, Reynier P, Muscatelli F, Gambarelli F et al. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1993;49(3):364-9.

Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, Toga B, Quilici M. 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(3): 746–749.

Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 2009 Dec;136(14):1915-34.

Quintella LP, Cuzzi, T, Madeira, Okamoto, T, Schubach, AO. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture confirmed American Tegumentary Leishmaniasis. *Rev do Inst de Med Trop de São Paulo (Impresso)*. 2009;51: 83-86.

Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J Clin Microbiol*. 1999;37(9):2931-5.

- Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Davies CR. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):748-51.
- Ren ZP, Sallstrom J, Sundstrom C, Nister M, Olsson Y. Recovering DNA and optimizing PCR conditions from microdissected formalin-fixed and paraffin-embedded materials. *Pathobiology* 2000;68:215-217.
- Rey L. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 2ª ed: Editora Guanabara Koogan SA: 2ª edição.; 1991.
- Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Br Med J.* 1903 November 14; 2(2237): 1261–1262
- Rosati S, Ortoffi M, Profiti M, Mannelli A, Mignone W, Bollo E et al. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(6):1153-6.
- Roura X, Fondevila D, Sanchez A, Ferrer L. Detection of *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies of dogs using polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 1999;11(4):385-7.
- Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med Vet.* 1998;12:315-317.
- Shrout PE. Measurement reliability and agreement in psychiatry. *Stat Methods Med Res.* 1998;7:301-317.
- Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, de souza CM, Figueiredo FB. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol* 2011.
- Tafuri WL, Santos Rde L, Arantes RM, Goncalves R, de Melo MN, Michalick MS. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods* 2004;292(1-2):17-23.
- Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Goncalves A et al. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;50(5):557-65.
- Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009;164(2-4):118-123.
- Vilanova-Costa CAST, Nóbrega JB, Souto R, Cruz AD. Extração e purificação de DNA em material biológico parafinado. *Estudos.* 2008;35(1/2):143-152.
- Xavier SC, Andrade HM, Monte SJH, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MSM, Tafuri WL. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res.* 2006.

Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *J clin microbiol. Reviews* 1995;8: 113-130.

WHO. World Health Organization Control of Leishmaniases. Technical Report Series 2010.