

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque

**OTIMIZAÇÃO DE FERRAMENTAS MOLECULARES BASEADAS EM
MULTIPLEX PCR PARA INCLUSÃO DE CONTROLES DE QUALIDADE
AMOSTRAL NO DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES**

RECIFE

2014

Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque

OTIMIZAÇÃO DE FERRAMENTAS MOLECULARES BASEADAS EM MULTIPLEX
PCR PARA INCLUSÃO DE CONTROLES DE QUALIDADE AMOSTRAL NO
DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES

Dissertação apresentada ao curso de mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr^a Milena de Paiva Cavalcanti

RECIFE

2014

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

A345a Albuquerque, Suênia da Cunha Gonçalves de.
Desenvolvimento de ferramentas moleculares baseadas em multiplex PCR para inclusão de controles de qualidade amostral no diagnóstico das leishmanioses / Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque. – Recife: [s.n.], 2014.
124 p.: ilus., tab.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Milena Paiva Cavalcanti.

1. Leishmaniose – diagnóstico. 2. Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex. 3. Controle de qualidade. I. Cavalcanti, Milena de Paiva . II. Título.

CDU 61.001.76

Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque

OTIMIZAÇÃO DE FERRAMENTAS MOLECULARES BASEADAS EM MULTIPLEX
PCR PARA INCLUSÃO DE CONTROLES DE QUALIDADE AMOSTRAL NO
DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES

Dissertação apresentada ao curso de mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em ____ / ____ / ____

Banca Examinadora:

Dr^a Valéria Rêgo Alves Pereira
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Dept^o de Imunologia

Dr Fábio Lopes de Melo
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Dept^o de Parasitologia

Dr^a Milena de Paiva Cavalcanti (Orientadora)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Dept^o Imunologia

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães por acolher e fornecer o suporte e a estrutura necessários para o desenvolvimento deste estudo.

Aos pacientes e proprietários de animais, agradeço pela hospitalidade durante as coletas em campo, bem como por fornecer as amostras utilizadas. A estas pessoas, também dedico este trabalho.

À minha orientadora e amiga, Dra. Milena de Paiva-Cavalcanti, pela confiança, respeito e paciência. Minha gratidão é mais do que as palavras podem expressar.

Ao Dr Sinval P. Brandão-Filho e M^a Edileuza Brito, por oferecer a mão amiga diante de cada necessidade, demonstrando sua confiança e disposição em ajudar. Muito obrigada.

À Dra. Luciana Figueredo, Dra. Claudia Cafarchia e Dr. Domenico Otranto, da Universidade de Bari (Itália), por fornecer material biológico e ajuda teórica para o manuseio das leveduras utilizadas neste trabalho.

A Rômulo Pessoa e Lays Trajano, por contribuir diretamente com a realização dos experimentos. Nossas discussões, seu empenho e sua disponibilidade foram fundamentais para a evolução e conclusão deste trabalho. A eles, minha mais profunda gratidão.

A Rayana Moraes pelo espírito de equipe, a amizade e os valiosos conselhos que na escuridão clarearam a estrada.

Obrigada à equipe de Leishmanioses do Laboratório de Imunoparasitologia e Serviço de Referência, por toda a colaboração, momentos de descontração e apoio que fizeram o dia-a-dia mais leve e prazeroso.

A todos os colegas da primeira turma de mestrado acadêmico em Biotecnologia da FIOCRUZ-PE pelo trabalho em conjunto durante as disciplinas; em especial a Anna Lígia Figueiredo, Elisa de Almeida, Eloína Santos, Lais Rodrigues, e Pietra Costa, que compartilharam dúvidas e soluções ajudando na construção dos conhecimentos.

À minha família, pelo apoio sem o qual eu nada faria. Ao meu marido Gleison, por somar as alegrias, subtrair as dificuldades e multiplicar o amor, sempre sabendo dividir minha atenção com o meu trabalho.

A todos aqueles que aqui não foram mencionados, mas que indubitavelmente contribuíram indiretamente para que eu alcançasse este objetivo, meu 'muito obrigada'!

À CAPES, pelo suporte financeiro ao meu aperfeiçoamento profissional. À FACEPE, FIOCRUZ e CNPq pelo financiamento dos projetos envolvidos.

E por fim, a Deus.

O saber a gente aprende com os mestres e com os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes.

Cora Coralina

ALBUQUERQUE, S. C. G. **Desenvolvimento de ferramentas moleculares baseadas em multiplex PCR para inclusão de controles de qualidade amostral no diagnóstico das leishmanioses.** 2014. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

RESUMO

A detecção precoce das leishmanioses e a rápida instituição do tratamento são de suma importância para os indivíduos e comunidades afetadas, visto que pacientes contribuem para a manutenção do ciclo da doença. Diante das limitações apresentadas pelos métodos tradicionais de diagnóstico, a PCR tem se apresentado como ferramenta promissora para a detecção dos casos. No entanto, perdas de DNA durante o processo de purificação podem afetar mais significativamente o material genético dos parasitos, gerando resultados falso-negativos. Este estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar dois protocolos de triplex PCR para investigar possíveis causas de negatividade no diagnóstico molecular das formas visceral (LV) e tegumentar (LT) das leishmanioses. Pares de *primers* para detecção de um controle interno (gene G3PD) e dois controles externos (DNA genômico de *M. pachydermatis* e plasmídeo comercial pUC18) foram adaptados a protocolos de PCR convencionais validados para a detecção de *L. infantum* e *L.(V.) braziliensis* e duas reações triplex foram otimizadas. Dados de sensibilidade (S), especificidade (E) e eficiência (e) dos novos sistemas foram calculados em 186 amostras de sangue coletadas de cães em áreas endêmicas, utilizando como referência protocolos de PCR e PCR em tempo real (qPCR) consagrados na literatura. A concordância entre os novos testes e os testes de referência foi determinada pelo cálculo do índice de *Kappa*. A triplex PCR para o diagnóstico da LV mostrou S = 78.68%, E = 85.29% e e = 81.05% com boa concordância ($K = 0.60$, $p < 0.0001$) com o conjunto de resultados PCR/qPCR. Para o diagnóstico da LT observou-se S = 97.29%, E = 79.16%, e = 90.16%, com $K = 0.78$, ($p < 0.0001$) indicando excelente nível de concordância entre os testes. As novas ferramentas apresentadas podem ser aplicadas para aumentar a acurácia no diagnóstico das leishmanioses, contribuindo para a rápida implementação do tratamento e, reduzindo a longo prazo os índices de mortalidade e morbidade das leishmanioses.

Palavras-Chave: Leishmaniose; Diagnóstico; Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex; controle de qualidade

ALBUQUERQUE, S. C. G. **Development of molecular tools multiplex PCR-based for the inclusion of sample quality controls in the diagnosis of leishmaniasis.** 2014. Dissertation (Master in Biosciences and Biotechnology Applied to Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

ABSTRACT

Early detection of leishmaniasis and rapid initialisation of treatment are paramount for individuals and communities affected, since infected people contribute to maintain the disease cycle. Due to the limitations presented by traditional diagnostic methods, PCR has emerged as a promising tool for the detection of cases. Loss of DNA during the purification process can affect more significantly the genetic material of the parasites and causing false-negative results. This study aimed to develop and evaluate two triplex PCR protocols to investigate possible causes of negativity in molecular diagnosis of visceral (VL) and cutaneous (CL) of leishmaniasis. Pairs of primers for the internal control detection (G3PD gene) and two external controls (genomic DNA of *M. pachydermatis* and commercial plasmid pUC18) were adapted to conventional PCR protocols validated for the detection of *L. infantum* and *L.(V.) braziliensis* and two triplex reactions were optimized. The sensitivity (S), specificity (Sp) and efficiency (e) of the new systems were calculated in 186 blood samples collected from dogs in endemic areas, using as reference PCR and real-time PCR (qPCR) protocols established in the literature. The level of agreement between the new test and the reference tests was determined by calculating the *Kappa* index. The triplex PCR for the diagnosis of VL showed S = 78.68%, Sp = 85.29% and e = 81.05% with good agreement (K = 0.60, p <0.0001) with the results of PCR/qPCR. For the diagnosis of CL, S = 97.29%, Sp = 79.16% and e = 90.16% were observed with K = 0.78, (p <0.0001) indicating excellent level of agreement between the tests. The new tools presented herein can be applied to increase the accuracy in the diagnosis of leishmaniasis, contributing to the rapid implementation of treatment and reducing the mortality and morbidity of leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis; Diagnosis; Multiplex Polymerase Chain Reaction; quality control

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Ciclo de biológico de <i>Leishmania</i> spp.	22
Figura 2-	Representação esquemática da ultraestrutura de parasitos do gênero <i>Leishmania</i> spp.	24
Figura 3-	Conjunto de critérios e técnicas utilizadas no diagnóstico clássico das formas tegumentar e visceral das leishmanioses.	27
Figura 4-	Fluxograma de trabalho seguido para a otimização e avaliação dos sistemas de multiplex PCR compostos para o diagnóstico da LT e LV.	38
Figura 5-	Teste inicial do sistema de <i>primers</i> P1.	45
Figura 6-	Diluições decrescentes do plasmídeo comercial pUC18 para determinação do limite de detecção.	45
Figura 7-	Determinação da concentração de P1f e P1r a ser incluída na reação de mLTA.	46
Figura 8-	Teste inicial realizado com diferentes concentrações dos <i>primers</i> Mf / Mr, nas condições de reação padronizadas para o sistema pUC 18.	46
Figura 9-	Teste da reação triplex PCR para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar.	48
Figura 10-	Amplificação simultânea dos três alvos da triplex PCR LT, utilizando DNA de <i>M. pachydermatis</i> como controle externo.	48
Figura 11-	Limite de detecção do controle externo <i>M. pachydermatis</i> na triplex PCR.	49
Figura 12-	Limite de detecção do controle externo <i>M. pachydermatis</i> na triplex PCR pós-extração.	49
Figura 13-	Limite de detecção de <i>L.(V.) braziliensis</i> na reação triplex otimizada.	50
Figura 14-	Teste preliminar do sistema Mf / Mr para detecção do DNA genômico de <i>M. pachydermatis</i> como controle externo, nas condições de reação da mLTV.	51

- Figura 15-** Reação tríplex PCR padronizada, com amplificação simultânea do alvo (*L. infantum*) e controles interno (G3PD) e externo (M.p - *M. pachydermatis*). 53
- Figura 16-** Limite de detecção de *L. infantum* na reação tríplex otimizada. 53
- Figura 17-** Conjuntos de resultados possíveis e positivities observadas para os três alvos entre as amostras de campo testadas pelos novos testes. 55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos pelos novos testes e o diagnóstico verdadeiro (testes de referência).	43
Quadro 2-	Sequências dos <i>primers</i> desenhados e tamanho dos produtos de amplificação dos dois sistemas desenhados para detecção dos controles externos.	44
Quadro 3-	Condições de reação e ciclagem padronizadas para triplex PCR para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar Americana com detecção simultânea de controles interno (gene G3PD de mamífero) e externo (pUC18).	47
Quadro 4-	Condições de reação e ciclagem padronizadas para triplex PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral com detecção simultânea de controles interno (gene G3PD de mamífero) e externo (<i>M. pachydermatis</i>).	52
Quadro 5-	Índices de concordância e indicadores de validade clínica calculados para o total de amostras e amostras válidas, frente aos resultados de protocolos consagrados de PCR e PCR em tempo real.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool of nucleotides</i>
CE	Controle externo
CI	Controle interno
CPqAM	Centro de pesquisas Aggeu Magalhães
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ETS	<i>External transcribed spacer</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G3PD	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência indireta
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
kDNA	<i>Kinetoplast desoxiribonucleic Acid</i>
kDNA1	Protocolo de PCR para a detecção de <i>L. (V.) braziliensis</i>
LACENS	Laboratórios centrais de saúde pública
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutâneo-difusa
LCM	Leishmaniose cutâneo-mucosa
LINF 1B	Protocolo de PCR para a detecção de <i>L. infantum</i>
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
mLT	Multiplex PCR para o diagnóstico da LT
mLV	Multiplex PCR para o diagnóstico da LV
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NPT	Núcleo de plataformas tecnológicas
NTC	<i>Non template control</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pUC 18	Plasmídeo comercial pUC 18
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>

rDNA	<i>Ribosomal desoxiribonucleic acid</i>
RNA	<i>ribonucleic Acid</i>
rRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i>
RT PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SRL	Serviço de referência em leishmanioses
tLT	Tríplice PCR para o diagnóstico da LT
tLV	Tríplice PCR para o diagnóstico da LV
USA	<i>United States of America</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Etiologia das leishmanioses	19
2.2 Epidemiologia	20
2.3 Ciclo biológico, vetores e reservatórios	21
2.4 Biologia molecular de <i>Leishmania</i> spp.	23
2.5 Diagnóstico das leishmanioses	25
2.5.1 Diagnóstico molecular	29
2.5.2 Aplicação de controles internos e externos de qualidade ao diagnóstico molecular por PCR	30
2.5.3 Plasmídeo comercial pUC18	32
2.5.4 <i>Malassezia pachydermatis</i>	33
3 JUSTIFICATIVA	34
4 PERGUNTA CONDUTORA E HIPÓTESE	35
4.1 Pergunta condutora	35
4.2 Hipótese	35
5 OBJETIVOS	36
5.1 Geral	36
5.2 Específicos	36
6 MATERIAL E MÉTODOS	37
6.1 Desenho do estudo	37
6.2 Amostragem	37
6.3 Coleta de sangue	37
6.4 Considerações éticas	38
6.5 Extração de DNA	38
6.6 Multiplex PCR convencional para o diagnóstico da LT	39
6.6.1 Escolha dos controles externos e desenho de <i>primers</i>	39
6.6.2 Avaliação preliminar dos controles externos	39
6.6.3 Otimização do sistema tríplex PCR para LT	40
6.7 Multiplex PCR convencional para o diagnóstico da LV	41
6.7.1 Escolha do alvo	41

6.7.2 Avaliação preliminar do controle externo	41
6.7.3 Otimização do sistema tríplice PCR para LV	41
6.8 Sequenciamento dos produtos de PCR para confirmação da especificidade dos novos sistemas	42
6.9 Análise e documentação dos resultados	42
6.10 Avaliação da concordância entre novos testes e testes de referência	42
6.11 Indicadores de validade clínica - sensibilidade, especificidade e eficiência	43
7 RESULTADOS	44
7.1 Multiplex PCR convencional para o diagnóstico da LT	44
7.1.1 Escolha dos alvos e desenho de <i>primers</i>	44
7.1.2 Avaliação preliminar dos controles externos	44
7.1.3 Otimização do sistema tríplice PCR para LT	47
7.2 Multiplex PCR convencional para o diagnóstico da leishmaniose visceral	51
7.2.1 Escolha do alvo	51
7.2.2 Avaliação preliminar do controle externo	51
7.2.3 Otimização do sistema tríplice PCR para LV	52
7.3 Confirmação da especificidade dos novos sistemas por sequenciamento de DNA	54
7.4 Avaliação das novas ferramentas para o diagnóstico da LV e LT	54
8 DISCUSSÃO	57
9 CONCLUSÕES	64
10 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE A - Termos de Consentimento Livre e Esclarecido	76
APÊNDICE B - Artigo relacionado publicado no período	78
APÊNDICE C - Artigo relacionado aceito para publicação	88
APÊNDICE D - Artigo relacionado submetido à publicação	103
APÊNDICE E - Artigos não relacionados publicados no período	119
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais	122
ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	124

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias causadas por protozoários (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) do gênero *Leishmania* transmitidas ao homem por picadas de insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos (CHAPPUIS et al., 2007). A doença pode se apresentar nas formas tegumentar (LT) ou visceral (LV) de acordo com a espécie parasitária envolvida, e difere em distribuição geográfica, hospedeiro/vetor e taxas de incidência e de mortalidade (MARZOCHI; MARSDEN, 1991). A detecção precoce e a rápida instituição do tratamento são de suma importância para o indivíduo e para a comunidade, uma vez que pacientes infectados atuam como reservatórios contribuindo para a transmissão e manutenção do ciclo da doença (CHAPPUIS et al., 2007).

A confirmação diagnóstica requer a demonstração da presença do protozoário em lesão cutânea (LT), em raspados de pele (LT), aspirados de tecidos linfóide (LV), hepático (LV), ou em cultura; sendo métodos de diagnóstico atualmente utilizados: exames parasitológicos, testes sorológicos e cultivo dos parasitos (BRASIL, 2010). O exame microscópico e a cultura são pouco sensíveis, sendo esta última passível de contaminações e delongada na definição do diagnóstico. Métodos sorológicos podem ser úteis, porém possuem problemas com reações cruzadas e não são capazes de diferenciar a infecção da doença ativa, além de não diagnosticar a doença em pacientes imunossuprimidos (IKONOMOPOULOS et al., 2003). Desta forma, ainda não existe um método classificado como padrão-ouro para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp. retardando o início do tratamento, a notificação dos casos e a elaboração de estratégias eficientes de controle.

Devido às limitações apresentadas pelas atuais metodologias, existe a necessidade de se desenvolver ferramentas capazes de promover um diagnóstico acurado em curto espaço de tempo. Diante deste fato, os métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos, com destaque para a tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) e variações como a nested-PCR (ABATH et al., 2002; FISA et al., 2002), *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR), PCR multiplex (BAHK et al., 2004) e mais recentemente a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009, 2013), que possibilita a realização de estudos relacionados à carga parasitária, interação parasito-hospedeiro e monitoramento da terapia (CASTILHO et al., 2008; FRANCINO et al., 2006; MARY et al., 2004; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009, 2013).

Com aplicação das técnicas baseadas no princípio da PCR, a biologia molecular tem contribuído para a detecção do DNA do parasito com alta sensibilidade e especificidade (YANG; ROTHMAN, 2004). Porém, para um diagnóstico seguro, com margem mínima de erro, faz-se necessário a utilização de controles de qualidade amostral, com base na detecção de genes intrínsecos do espécime biológico (THELLIN et al., 1999). A positividade para estes genes demonstra a qualidade da amostra em relação à degradação do DNA ou presença de inibidores, reduzindo a possibilidade de emissão de um resultado falso-negativo (GONÇALVES et al., 2012). De modo semelhante, a detecção de uma sequência extrínseca de DNA propositalmente adicionada à amostra, pode demonstrar possíveis perdas do material durante o processo de purificação (MUMY; FINDLAY, 2004). No entanto, comumente as avaliações da qualidade amostral e da extração são feitas em ensaios separados, gerando mais custos e prolongando o tempo para a determinação do diagnóstico.

Levando em consideração os avanços e a versatilidade da biologia molecular, o presente estudo teve como objetivo padronizar e avaliar protocolos de multiplex PCR capazes de detectar pequenas quantidades do DNA alvo parasitário (*L. infantum* / *L. (V.) braziliensis*), simultaneamente a controles da qualidade amostral: o gene para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PD) de mamíferos como controle interno da reação, e DNAs exógenos (pUC18 / *Malassezia pachydermatis*) adicionados à amostra como controle do processo de extração.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Etiologia das leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças de caráter zoonótico que acometem o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos (GALATI, 1995). A parasitose afeta as células do sistema mononuclear fagocitário apresentando uma variedade de síndromes, de modo que pode desenvolver as formas tegumentar (LT) e visceral (LV) de acordo com a espécie parasitária envolvida, e diferem em distribuição geográfica, hospedeiros, vetores e taxas de incidência e de mortalidade (MARZOCHI; MARSDEN, 1991). Trinta espécies de *Leishmania* são conhecidas, sendo 20 patogênicas ao homem (ASHFORD, 2000; LÓPEZ-CÉSPEDES et al., 2012).

A LT é caracterizada por um amplo espectro de manifestações clínicas: lesões cutâneas ulcerativas desenvolvidas no local da picada do flebotomíneo (forma cutânea localizada - LC); múltiplos nódulos não ulcerativos (forma cutâneo-difusa - LCD) e inflamações mucosas destrutivas (forma mucosa - LCM). Na maioria das vezes, a doença apresenta-se como uma lesão ulcerada única com bordas elevadas e fundo granuloso (BRASIL, 2010a). O espectro clínico observado reflete a complexidade da etiologia destas formas da doença: *L. (Viannia) braziliensis* está distribuída na América do Sul, América Central e México podendo causar tanto LC quanto a forma mucosa; outras espécies dermatrópicas como *L. (V.) peruviana* (Peru), *L. (V.) panamensis* (América Central e Norte da América do Sul), *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, e *L. (V.) colombiensis*, *L. (Leishmania) amazonensis* (América do Sul), *L. (L.) mexicana* (América Central, México e Estados Unidos), *L. (L.) pifanoi* e *L. (L.) venezuelensis* (América do Sul) têm sido isoladas de pacientes com as formas localizada e difusa de acordo com a área geográfica (BRASIL, 2007; PISCOPO; MALLIA, 2006; REITHINGER et al., 2007).

Em humanos a LV é causada principalmente por duas espécies de *Leishmania*, cada uma tendo uma distribuição regional mundial característica. A espécie *Leishmania infantum*, tem sido demonstrada como agente causador da LV no Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia Central, China e América Central e do Sul, enquanto *Leishmania donovani* foi identificada na Índia e na África Oriental (STOCKDALE; NEWTON, 2013). Esta forma da doença pode ainda eventualmente ser causada por *L. tropica* ou *L. amazonensis* nas Américas (GILL; BEECHING, 2009). As manifestações clínicas da LV caracterizam-se por um amplo espectro, que pode variar de discretas (oligossintomáticas) a moderadas e graves, e que se não tratadas

podem levar o paciente à morte. Febre e esplenomegalia são os principais sinais clínicos do desenvolvimento da doença. (BRASIL, 2010a).

Os principais agentes etiológicos circulantes no Brasil são *Leishmania braziliensis* e *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) (MAURICIO et al., 2000), responsáveis pelo desenvolvimento das formas tegumentar e visceral, respectivamente (BRASIL, 2006, 2007). No entanto, já foram identificados sete agentes causadores das diferentes formas cutâneas no país, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três espécies mais encontradas em casos de LT são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2007).

2.2 Epidemiologia

As leishmanioses representam uma das endemias parasitárias de maior importância em termos de saúde pública no mundo, com uma extensa distribuição nas Américas, especialmente na América Latina (LAINSON, 1983). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco em 98 países, com registro aproximado de dois milhões de novos casos, das diferentes formas clínicas ao ano (ALVAR et al., 2012). Depois de malária e tripanossomíase Africana (doença do sono) as leishmanioses são a terceira mais importante doença transmitida por vetor e está em nono lugar em termos de carga global da doença entre todas as doenças infecciosas e parasitárias (HOTEZ et al., 2004), sendo responsável por mais de 57.000 mortes por ano (HOTEZ et al., 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000). Ambas as formas clínicas da leishmaniose foram inicialmente caracterizadas como doenças de caráter eminentemente rural; no entanto, recentemente a doença vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte (BRASIL, 2010a).

Pouco é sabido sobre as taxas de prevalência e de incidência na população comprometida, visto que o sistema de notificação é falho apesar de o registro dos casos ser obrigatório em muitos países, inclusive no Brasil. Assim, os índices de incidência/prevalência encontrados nas bases de dados oficiais destes países não expressam o grau de comprometimento real da população (MAIA-ELKHOURY et al., 2007). Segundo Stockdale e Newton (2013), existem várias razões para a sub-notificação dos casos de leishmaniose, entre

elas, a não disponibilidade de testes diagnósticos, o número de infecções assintomáticas e a falta de acesso das populações carentes aos serviços de saúde.

Alvar e outros (2012) estimam que ocorram entre 700 mil a 1,2 milhões de casos de LT e 200 e 400 mil casos de LV por ano. Mais de 90% dos casos de LV estão concentrados no sul da Ásia, no continente Africano e no Brasil, enquanto a grande maioria dos casos de LT, estão distribuídas nas Américas, Leste Asiático e região do Mediterrâneo.

No âmbito nacional, embora a sub-notificação seja um problema constante, tem sido registrado um aumento crescente no número de casos de ambas as formas da doença nos últimos 20 anos, observando-se surtos epidêmicos em todas as regiões do país. Portanto, o Brasil ocupa atualmente a posição de principal responsável pelos casos registrados na América Latina (BRASIL, 2006).

A LT apresenta ampla distribuição, com casos autóctones em todas as regiões brasileiras (BRASIL, 2007). Em Pernambuco, a doença incide em todas as regiões, com predominância (mais de 60% dos casos) na região correspondente à Zona da Mata, sendo quase totalmente na forma cutânea localizada (BRANDÃO-FILHO et al., 1999; BRITO et al., 2012).

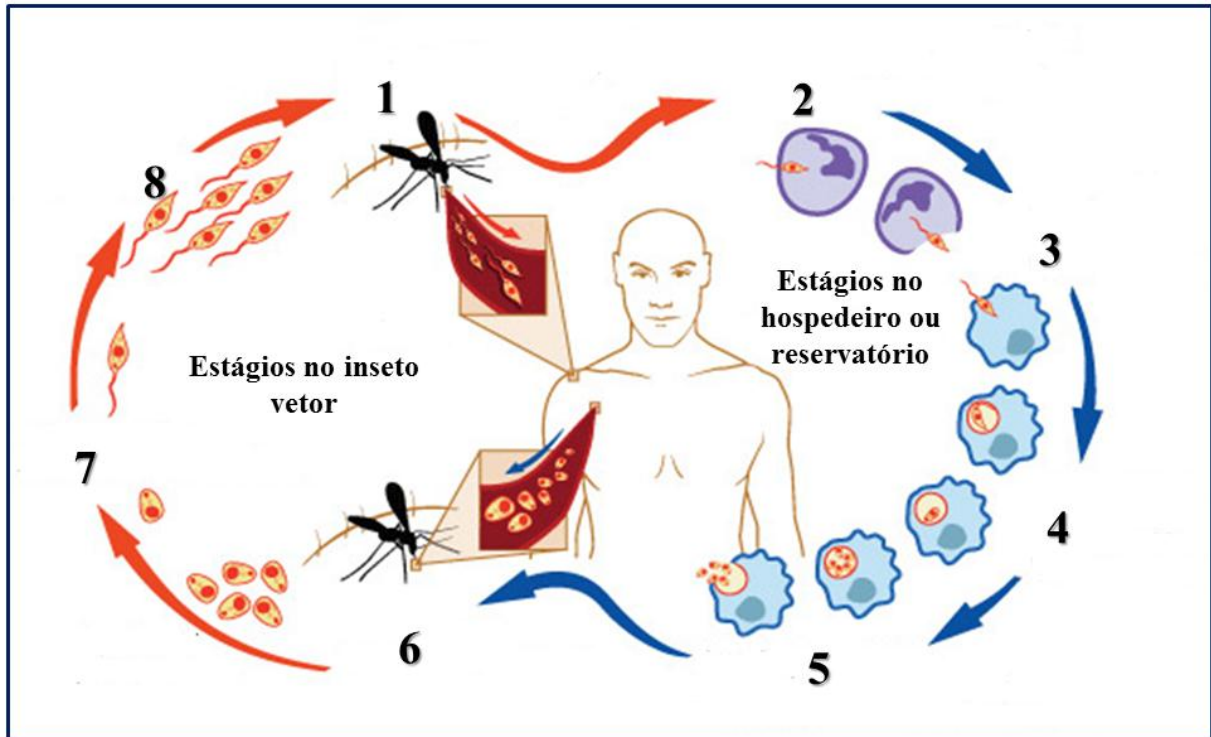
A LV está distribuída em 21 estados da Federação, atingindo as cinco regiões brasileiras. A doença constitui-se em importante problema de saúde pública, cuja letalidade pode alcançar 90% quando não se institui o tratamento adequado (BRASIL, 2010a, 2010b). Apesar do aumento da distribuição dos casos entre as regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste na última década, o Nordeste ainda apresenta 65% dos casos do país. Apenas no estado de Pernambuco foram notificados no período entre 2003 e 2010, 635 novos casos de LV em humanos (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2013).

2.3 Ciclo biológico, vetores e reservatórios

O ciclo evolutivo dos parasitos do gênero *Leishmania* compreende uma fase no hospedeiro invertebrado onde os parasitos multiplicam por divisão binária, e outra fase no hospedeiro vertebrado no qual formas amastigotas vivem e se multiplicam no interior dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos. Fêmeas de insetos flebotomíneos, hospedeiros intermediários desses parasitos, são infectadas quando formas amastigotas são sugadas durante o repasto sanguíneo. No trato digestivo do inseto, o parasito sofre sucessivas

modificações, até que se transforma em promastigota, tornando-se novamente infectante ao hospedeiro definitivo mamífero (NEVES, 2004) (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo de biológico de *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de National Institute of Allergy and Infectious Diseases (2008).

Nota: **1)** Flebotomíneo injeta promastigotas pela pele durante o repasto sanguíneo; **2)** Promastigotas são fagocitadas por polimorfonucleares rapidamente recrutados para o local da picada; **3)** Polimorfonucleares infectados liberam os parasitas, que são internalizados por macrófagos; **4)** Promastigotas se transformam em amastigotas no interior dos macrófagos; **5)** Amastigotas se multiplicam no interior de macrófagos em vários tecidos; **6)** Fêmeas de flebotomíneos ingerem macrófagos infectados durante o repasto sanguíneo; **7)** Amastigotas se transformam em promastigotas (formas infectantes) no intestino do inseto; **8)** Promastigotas se dividem e migram para a região esofágica do vetor, de onde serão liberados reiniciando o ciclo.

No Brasil, a transmissão de *Leishmania* está associada a insetos flebotomíneos das espécies *L. whitmani*, *L. intermedia* e *L. migonei* (LT) (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994) ou *Lutzomyia cruzi* e *L. longipalpis* (LV) (GONTIJO; MELO, 2008). Os flebotomíneos são mosquitos pequenos de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, com patas longas e delgadas, e o corpo densamente piloso. Voam aos saltos e mantêm as asas eretas mesmo em repouso, ao contrário de outros dípteros da subfamília Phlebotominae, o que facilita a sua identificação. O sangue, ingerido durante o repasto, é necessário para a maturação dos ovos. Os machos se alimentam de sucos de flores e plantas, sendo considerados fitófagos (BASANO; CAMARGO, 2004). Estes insetos são conhecidos popularmente, como mosquito

palha, tatuquira, birigui, entre outros, dependendo da área geográfica e constituem insetos pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* (MARZOCHI, 1992; YOUNG; DUNCAN, 1994).

A maioria das espécies de *Leishmania* tem origem zoonótica, sendo a variante antroponótica (*L. donovani*), ocorrente na Índia, Sudão e Afeganistão, consequência da adaptação de algumas espécies a estes ciclos (SHAW, 2007). Segundo Noyes (1998a), o homem é considerado hospedeiro acidental (antropozoonose), enquanto o protozoário infecta cerca de nove ordens de mamíferos e répteis em áreas subtropicais e tropicais do mundo.

L. (V.) braziliensis foi identificada em roedores silvestres como *Bolomys lasiurus* e *Nectomys squamipes* no estado de Pernambuco (BRANDÃO-FILHO et al., 1998), e possui entre outros reservatórios animais domésticos como o cão (CE, BA, ES, RJ e SP), eqüinos e mulas (CE, BA e RJ), albergando em proporção expressiva o parasito (BRASIL, 2010a). O cão (*Canis familiaris*) é incriminado como principal reservatório de *L. infantum*, e a infecção em cães tem sido mais prevalente que no homem nas áreas urbanas (BRASIL, 2010a).

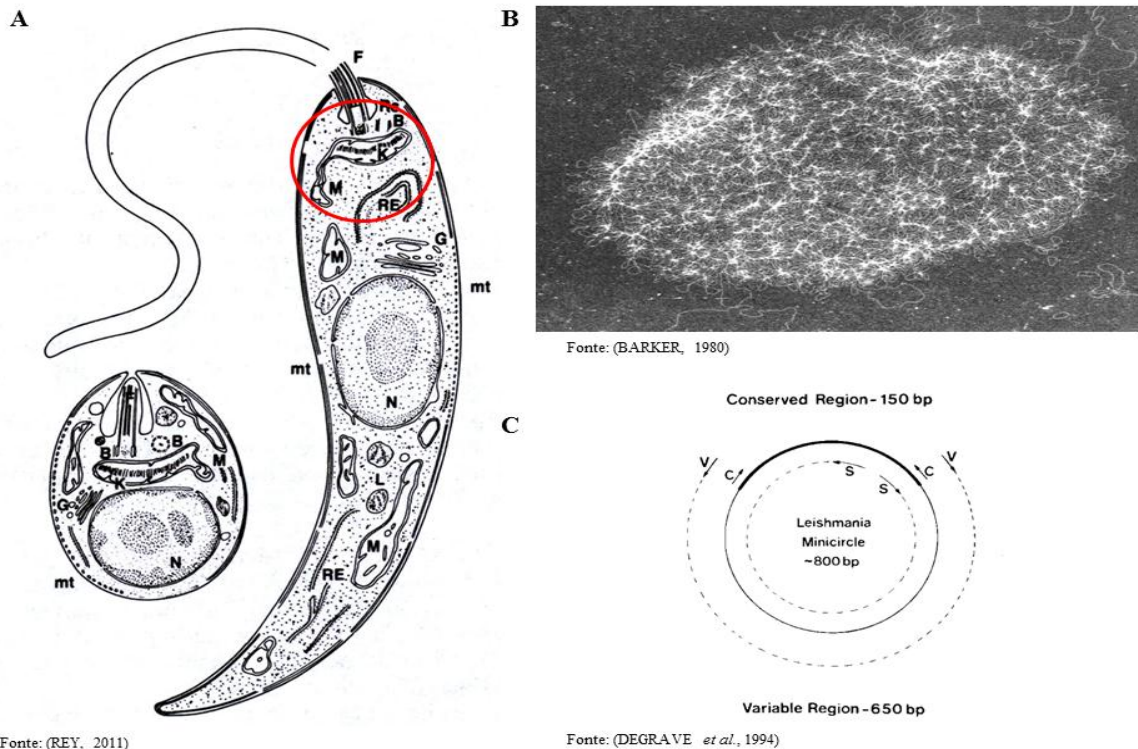
A multiplicidade de fatores envolvidos na transmissão e diagnóstico das leishmanioses constitui-se em dificuldades para se formular estratégias eficientes de controle da doença (GOMES; NEVES, 1998). Nos últimos 12 anos, avanços científicos importantes têm sido feitos no tratamento, diagnóstico e prevenção das leishmanioses. Estes desenvolvimentos têm facilitado a implementação de programas de controle regional e nacional; no entanto, a eficácia destas estratégias ainda é insuficiente e os índices de morbidade e mortalidade das leishmanioses em todo o mundo mostram uma tendência crescente e preocupante (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010a).

2.4 Biologia molecular de *Leishmania* spp.

De modo geral, os microrganismos do gênero *Leishmania* correspondem a um grupo de protozoários unicelulares biologicamente distinto. Possuem uma mitocôndria incomum que contém características de ácido desoxirribonucléico (DNA), conhecida por cinetoplasto (Figura 2 A). O cinetoplasto é incomum porque possui arranjos de dezenas de maxicírculos e milhares de minicírculos que juntos, formam uma rede compacta de DNA chamado kDNA (Figura 2 B), que corresponde entre 15% e 35% do DNA total celular (BREWSTER; ASLETT; BARKER, 1998; BREWSTER; BARKER, 2002; LAMBSON; BARKER, 2002; SIMPSON, 1987). Cada célula contém cerca de 50 maxicírculos (20.000 a 35.000 pares de

base - pb), que contêm genes que codificam proteínas mitocondriais e o RNA ribossomal (rRNA), enquanto os minicírculos estão em número de 10.000 a 20.000, com sequências de 500 a 2.500 pb (CORTES, 2008).

Figura 2 - Representação esquemática da ultraestrutura de parasitos do gênero *Leishmania* spp.



Fonte: Barker (1980), Degraive et al. (1994) e Rey (2011).

Nota: (A) Formas amastigota (esq.) e promastigota (dir.) de *Leishmania*, com destaque para a localização do cinetoplasto (K) no círculo vermelho; B) micrografia eletrônica demonstrando a disposição dos maxicírculos e minicírculos de DNA; C) esquematização das regiões de variação e conservação de sequências no minicírculo.

Os minicírculos representam 95% do kDNA (RAY, 1987); contêm cerca de 800 pares de base (pb) em tamanho sendo, aproximadamente, 200 pb em uma região conservada e 600 pb em região variável (Figura 2 C) (BARKER, 1980; MORALES et al., 2001; NOYES et al., 1998). A característica de estar presente em grande número de cópias, com regiões conservadas para uma determinada espécie, têm levado diversos trabalhos a explorar o kDNA como alvo da PCR para fins de diagnóstico (BRUIJN; BARKER, 1992; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009; 2013), possibilitando a detecção com alta sensibilidade da infecção por *Leishmania* spp. em diferentes amostras clínicas (NOYES et al., 1998; MARY et al 2004).

O DNA ribossomal (rDNA) de *Leishmania* possui unidades repetidas dentro do nucléolo. Assim como em outras células eucarióticas, há cerca de 100 a 500 cópias do gene rDNA no genoma nuclear, onde 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 de rRNA 5,8S, um outro espaçador não codificante interno (ITS-2), uma região codificadora de rRNA 28S e, finalmente, um segmento intergênico espaçador não transcrito, IGS (MATEUS et al., 2006). Este alvo permite a diferenciação entre espécies de *Leishmania* spp. e também tem sido usado por diversos autores para o diagnóstico e identificação dos parasitos (VAN EYS et al., 1992; MEREDITH et al., 1993; LEMRANI et al., 2009).

2.5 Diagnóstico das leishmanioses

Tradicionalmente, as características clínicas em conjunto com o estudo do exame direto e testes sorológicos positivos representam a melhor evidência para o diagnóstico das leishmanioses (BRASIL, 2010a ; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Um esquema das técnicas utilizadas em conjunto como critérios diagnósticos da infecção por *Leishmania* está representado na Figura 3.

Técnicas de microscopia para a demonstração das formas amastigotas se configuraram como os primeiros métodos de referência no diagnóstico parasitológico (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010a). O requisito básico, seguro e determinante considerado como padrão-ouro no diagnóstico laboratorial das leishmanioses é a documentação de formas amastigotas em material obtido de raspados de lesão (LT), punção de medula óssea ou baço (LV) corados com *Giemsa* ou *Leishman*, analisados à microscopia óptica (BRASIL, 2010^a; DOURADO et al., 2007). Todavia, o exame microscópico direto tem limitações de sensibilidade e dificuldades de coleta, que o tornam ineficiente para o uso na rotina diagnóstica de ambas as formas de leishmaniose. A visualização microscópica de parasitos na LT é complexa, em virtude da pouca quantidade de parasitos encontrados nas lesões causadas por *L. (V.) braziliensis* e devido ao fato de que a visualização de amastigotas em biópsias de pele é mais difícil em virtude da grande variedade de tipos celulares e escassez de macrófagos (ASHFORD, 2000).

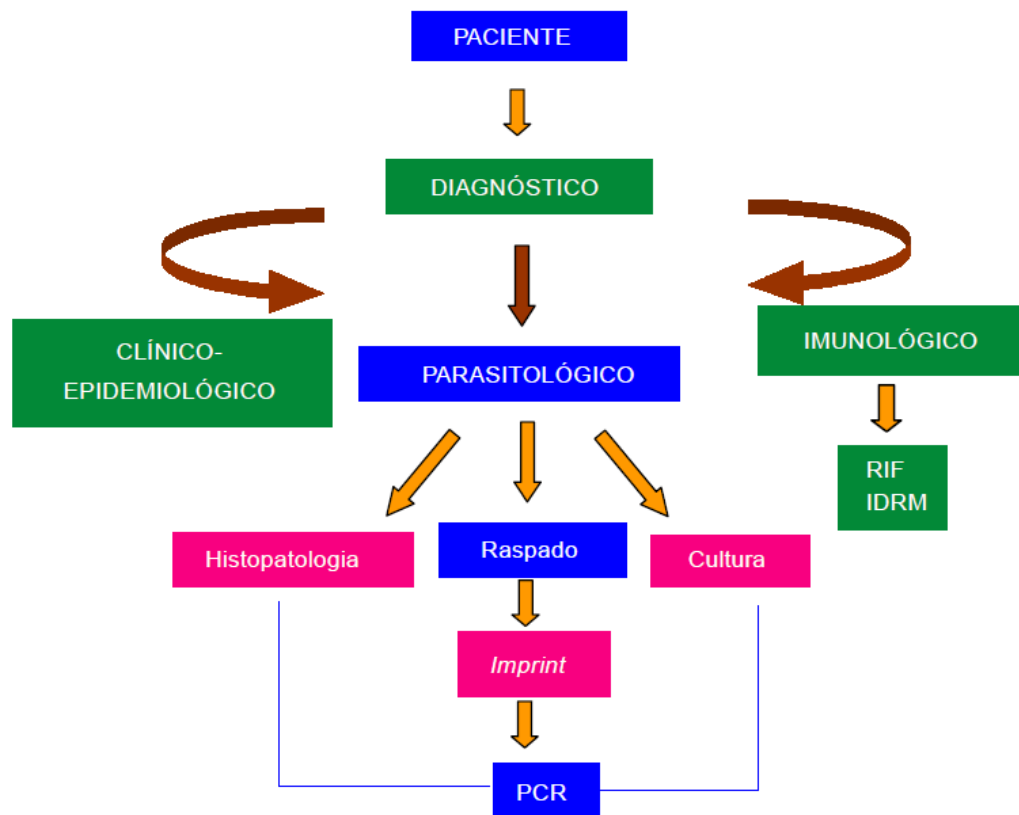
A sensibilidade dos testes parasitológicos para LT é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão: está em torno de 100% nos dois primeiros meses de evolução,

75% aos seis meses, sendo raros os parasitos após um ano de evolução da doença (CUBA-CUBA et al., 1985). Na maioria dos casos de LT, quando identificada pelos profissionais de saúde, a doença se apresenta na fase crônica, tornando esta limitação ainda mais exacerbada (ANDRADE et al., 2005).

Do mesmo modo, apesar da alta sensibilidade observada com punções esplênicas e de medula óssea na LV, estas amostras são consideradas procedimentos invasivos e exigem ambientes apropriados para a coleta, além de alto grau de treinamento técnico, não sendo consideradas adequadas para estudos epidemiológicos em larga escala (SUNDAR; RAI, 2002; SRIVASTAVA et al., 2007).

Uma forma alternativa e mais laboriosa de demonstração do parasito é o isolamento do parasito *in vivo*, que é obtido pelo inóculo do material de lesões em meio de cultura e em animais susceptíveis como o hamster (*Mesocricetus auratus*), ou *in vitro* (BRASIL, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Apesar de ser bastante sensível, o cultivo dos parasitos *in vitro* é susceptível a contaminações fúngicas e bacterianas provenientes do espécime biológico (PISCOPO; MALLIA, 2006).

Figura 3 - Conjunto de critérios e técnicas utilizadas no diagnóstico clássico das formas tegumentar e visceral das leishmanioses.



Fonte: Gontijo e Carvalho (2003).

Exames sorológicos e imunológicos tornaram-se úteis em ambos os casos (LT e LV) para triagem de doentes, diante da dificuldade de demonstração das formas amastigotas de *Leishmania*. Para o diagnóstico e estudos epidemiológicos da LT, o teste imunológico da intradermorreação de Montenegro (IDRM) tem sido amplamente utilizado (MARZOCHI, 1992; MARQUES et al., 2006; PASSOS et al., 2000). A IDRM permite avaliar a hipersensibilidade celular tardia, e é de grande valor presuntivo no diagnóstico de LT, constituindo valioso recurso nos casos em que os parasitos estão escassos ou ausentes, sendo bastante útil nos inquéritos epidemiológicos de prevalência em áreas endêmicas (KAR, 1995; SHAW; LAINSON, 1975). Entre as técnicas sorológicas, o *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e a Imuno Fluorescência Indireta (IFI) são recomendados, sendo a IFI a técnica diagnóstica de rotina, especialmente para LV (GONTIJO; CARVALHO, 2003; REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

A partir da década de 1970, surgiu a metodologia de Enzimaimunoensaio e algumas variações como Dot-ELISA, Fast-ELISA e micro ELISA, entre outras, que utilizam antígenos crus ou purificados (DOURADO et al., 2007). A utilização de antígenos recombinantes ou purificados, como as glicoproteínas de membrana gp 63, gp 70, gp 72 e rK39, específicas do gênero *Leishmania*, melhora a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico (SRIVASTAVA et al., 2011). A reação de Imunofluorescência Indireta (IFI), utilizada a partir da década de 1960 (DUXBURY; SADUN, 1964), é uma metodologia que utiliza formas promastigotas do parasito, que a limitam em termos de especificidade e reprodutibilidade (SUNDAR; RAI, 2002). Os antígenos mais utilizados são promastigotas fixados em lâminas, e amastigotas provenientes de fígado e baço de hamsters (DOURADO et al., 2007).

Anticorpos anti-leishmania estão presentes no soro de pacientes com LT e podem ser detectados por ELISA ou IFI, aglutinação direta e outros ensaios (GONTIJO; CARVALHO, 2003). No entanto, esses métodos devem ser realizados em centros de referência com pessoal treinado, acarretando em uma aplicabilidade limitada no diagnóstico de um caso de LT em curso, não sendo rotineiramente utilizados na prática clínica (ANDRADE et al., 2005). De modo semelhante, a IDRM é limitada pela positividade do teste durante a doença e após a cura, não diferenciando doença atual de regressa ou doença de infecção sendo, habitualmente negativo na forma difusa da LT, na forma visceral e em pacientes imunodeprimidos (ANDRADE et al., 2005).

A LV é caracterizada por uma marcada estimulação policlonal de linfócitos B, que resulta em hipergamaglobulinemia e grande produção de anticorpos, o que facilita o diagnóstico através de testes sorológicos, evitando os métodos parasitológicos, que são invasivos. Apesar disto, as metodologias sorológicas disponíveis diferem em sua sensibilidade e especificidade, e na sua aplicação prática nas condições de campo (CARVALHO et al., 2003; GONTIJO; MELO, 2004). Essas técnicas possuem limitações de uso, pois os anticorpos permanecem presentes após o tratamento (cicatriz sorológica), não permitindo avaliação de resposta terapêutica. Como há infecções subclínicas, um teste positivo também não necessariamente indica doença ativa (GONTIJO; MELO, 2004). Podem ocorrer, ainda, reações cruzadas com outras doenças, como tripanossomíase, hanseníase, malária, esquistossomose e tuberculose (SUNDAR et al., 2002; CARVALHO et al., 2003; SUNDAR, 2003).

2.5.1 Diagnóstico molecular

Na tentativa de superar as limitações apresentadas pelas técnicas clássicas, métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos desde a década de 1980 para identificação de grupos e espécies de *Leishmania* em variadas amostras clínicas tais como raspados de lesão ou fragmentos de biópsia (LT), ou em isolados de cultura, punção medular, esplênica e hepática (LV), e nas células mononucleares do sangue periférico, bem como pool de flebotomíneos (GENARO, 2002; MICHALSKY et al., 2002).

A vantagem dos testes de amplificação de DNA resulta de sua aplicação prática, tendo capacidade de examinar diretamente tecidos lesados ou isolados de *Leishmania*; alta sensibilidade para detecção de patógenos; tempo reduzido para identificação de um organismo; possibilidade de processamento de um grande número de espécimes com um ensaio automatizado; capacidade de distinção entre organismos morfológicamente similares; possibilidade de detecção de organismos não viáveis ou cultiváveis (COSTA, 1999; SHAW; GRIMALDI; CUPOLILLO, 2005). Desta forma, laboratórios médicos e veterinários, de diagnóstico e saúde pública, têm sido fortemente incentivados a adotar a técnica de PCR para doenças endêmicas; no entanto, para utilização em larga escala, a PCR necessita de ajustes para se tornar mais simples e com custo operacional mais baixo (FRANK, 2005).

A PCR permite a detecção altamente sensível e específica das leishmânias (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009; SCHONIAN et al., 2003). Esta aplicação é necessária para o diagnóstico diferencial com outras enfermidades antes do início do tratamento (REITHINGER; DUJARDIN, 2007), e os protocolos de PCR têm demonstrado, neste sentido, melhor performance que a microscopia e cultura especialmente em amostras com baixa carga parasitária (CRUZ et al., 2002; STRAUSS-AYALI et al., 2004; GARCIA et al., 2005).

Apesar da variedade de métodos moleculares avaliados como métodos diagnósticos, ensaios baseados em PCR ainda constituem um dos maiores avanços no diagnóstico, na pesquisa e na clínica (REITHINGER; DUJARDIN, 2007). Devido a este reconhecimento, a técnica da PCR tem sido modificada para expansão do seu uso e versatilidade (YANG; ROTHMAN, 2004). Variações como a PCR em tempo real (ou PCR quantitativa - qPCR) (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009), e a nested PCR (ABATH et al., 2002; FISA et al., 2002; AKHAVAN et al., 2010) tem sido desenvolvidas e estudadas. A possibilidade de utilização, na mesma reação, de mais de um par de *primers* com amplificação simultânea de múltiplas sequências do DNA-alvo é chamada de multiplex PCR. Assim, mais de uma

sequência de DNA, em uma mesma amostra, pode ser amplificada ao mesmo tempo (CHAMBERLAIN et al., 1988; GEHA et al., 1994; REA et al., 2001; BAHK et al., 2004).

Os sistemas LINF 1B (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009) e KDNA1 (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013) desenvolvidos recentemente para detectar *L. infantum* e *L. (V.) braziliensis*, respectivamente, através da amplificação de minicírculos de DNA pela técnica de PCR quantitativa, demonstraram alta sensibilidade e boa concordância com outros protocolos, tendo excelentes resultados em amostras de áreas endêmicas do estado de Pernambuco. Estes resultados sugeriram o uso destes protocolos como ferramenta diagnóstica na região, e sua padronização para uso em ensaios de PCR convencional.

2.5.2 Aplicação de controles internos e externos de qualidade ao diagnóstico molecular por PCR

Apesar de suas inúmeras vantagens, as técnicas de PCR apresentam deficiências. Os resultados da PCR dependem de algumas variáveis envolvidas, como área endêmica, tipo de amostra, alvo do DNA utilizado e método de extração do DNA (BRASIL, 2006). Protocolos de PCR precisam de otimização e padronização, e a fidelidade das reações de PCR consiste na eliminação da contaminação das amostras e inibidores de reação. Além disso, resultados falso-negativos podem ocorrer devido à faixa limitada de detecção em alguns ensaios. Em virtude destes obstáculos, a utilização de controles internos (CI) e controles de extração têm sido fortemente recomendada (REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

A grande desvantagem da maioria dos protocolos de diagnóstico por PCR publicados é não conter a amplificação interna de um controle de qualidade (HOORFAR et al., 2004). Em contraste com amplificação de um controle positivo, o CI é uma sequência de DNA não-alvo presente na própria amostra que é co-amplificado com a sequência alvo (LUND; MADSEN, 2006). Em uma PCR sem CI, um resultado negativo pode significar que não houve sequência alvo presente na reação mas, também pode significar que a reação foi inibida, devido a fatores tais como ao mau funcionamento de termociclador, mistura de PCR incorreta ou pobre atividade da DNA polimerase (RADSTROM et al., 2003). Por outro lado, numa PCR com CI, um sinal do controle será produzido mesmo que não haja nenhuma sequência alvo presente, podendo assim revelar possíveis falhas da técnica amostra por amostra (LUND; MADSEN, 2006).

A presença de inibidores em amostras de sangue e outros espécimes biológicos utilizados para o diagnóstico pode prejudicar a performance da reação de PCR. Proteínas, químicos e sais como Proteinase K, EDTA, Fenol, heparina e hemoglobina atuam neste sentido por três mecanismos principais: a) inativação da DNA polimerase termoestável; b) degradação ou captura de ácidos nucleicos; c) interferência na lise celular pré-PCR (RADSTROM et al., 2004). Além destes fatores, o desenho de *primers* com quantidade de bases GC maior que 50% dificulta a desnaturação; ou perdas de material genético do agente etiológico durante o processo de extração de DNA podem levar a não amplificação do alvo na reação (YANG; ROTHMAN, 2004; GONÇALVES et al., 2012).

A necessidade de inclusão de controles da qualidade amostral tem sido amplamente demonstrada na literatura (DONOSO et al., 2007; MAUBON et al., 2012). No entanto, comumente as avaliações da qualidade da amostra são feitas em ensaios separados, gerando mais custos e prolongando o tempo para a determinação do diagnóstico.

Recentemente, uma duplex PCR foi otimizada e padronizada para avaliar a integridade da amostra de DNA simultaneamente ao diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp. (GONÇALVES et al., 2012). A verificação da qualidade amostral foi feita pela amplificação do gene que codifica para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PD ou GAPDH), adicionando-se um sistema de *primers* capaz de detectar o gene G3PD em diversas espécies de mamíferos, a duas reações de PCR: uma para *L. infantum* (mLV) e outra para *L. (V.) braziliensis* (mLTA). A expressão deste gene em todas as células de mamíferos garante a sua detecção em amostras com condições apropriadas para o teste diagnóstico (SOLANO-GALLEGO et al., 2007; GILSBACH et al., 2006; CASTILHO et al., 2008). No estudo de Gonçalves e outros (2012), o controle interno demonstrou má qualidade em 33% das amostras testadas, as quais foram excluídas para a determinação do diagnóstico, uma vez que, apresentaram-se impróprias para este fim; confirmando a importância da verificação da qualidade amostral. Adicionalmente, algumas amostras de pacientes sabidamente doentes e com boa qualidade demonstrada, tiveram o resultado negativo para o alvo principal (*L. infantum*), provavelmente devido à perdas inerentes ao processo de purificação.

Os resultados de Gonçalves e outros (2012) corroboram o fato de que mesmo em amostras íntegras e próprias para execução de diagnóstico pela técnica de PCR, o processo de extração é uma etapa crítica, passível à co-extração de sais e proteínas que inibem a hibridização DNA-DNA e as reações enzimáticas na PCR (MUMMY; FINDLAY, 2004). Além disso, a extração também pode resultar em pequenas perdas do DNA alvo, devido a

fatores como pobre recuperação de material genético na eluição e lise incompleta de células (ALM et al., 2000; MUMY; FINDLAY, 2004).

A detecção de uma sequência de DNA propositalmente adicionada à amostra pode demonstrar eventuais perdas do material genético durante o processo de purificação (MUMY; FINDLAY, 2004; BERG et al., 2005; GONÇALVES et al., 2012), o que pode ser utilizado para superar as limitações referentes às perdas inerentes a este processo. Mummy e Findlay (2004) demonstraram a utilidade de um plasmídeo como controle externo da purificação de DNA em amostras de solo, reportando a eficiência de diferentes métodos de extração. A utilidade da inclusão de controles externos tem sido demonstrada em diversos tipos de amostras cuja extração de DNA é difícil (CUBERO et al., 2002; LUND; MADSEN, 2006; LEBLANC-MARIDOR et al., 2011; MURPHY et al., 2007), no entanto, sua aplicação ainda não foi explorada em amostras de sangue para fins diagnósticos.

2.5.3 Plasmídeo comercial pUC18

O plasmídeo comercial pUC18 caracteriza-se como um pequeno fragmento de DNA fita dupla, amplamente utilizado como vetor de clonagem e também na manipulação de fragmentos de DNA (XAVIER, 2009). Uma grande variedade de plasmídeos comerciais estão disponíveis e têm sido aplicados para a construção de bibliotecas gênicas ou para a clonagem direta de genes (VIEIRA; MESSING, 1982). Alguns plasmídeos tornaram-se clássicos, como o pBR322, pUC18 e o pUC19, que tornou-se um clássico pelo novo paradigma da seleção por cor, permitindo a expressão de uma proteína quimérica com beta-galactosidase, que permite a identificação a olho nu de colônias transfectadas no procedimento de clonagem (YANISCH-PERRON; VIEIRA; MESSING, 1985). O baixo custo desta ferramenta molecular e a facilidade de sua multiplicação e obtenção em laboratório estimularam sua escolha como um dos controles externos neste estudo. A adição de uma quantidade conhecida deste DNA exógeno pode reportar possíveis perdas do material genético do agente etiológico durante a purificação de DNA de amostras de sangue total, permitindo a redução da liberação de resultados falsos negativos decorrentes desta problemática.

2.5.4 *Malassezia pachydermatis*

Malassezia pachydermatis é uma levedura caracterizada por ser lipofílica, mas não lipodependente, diferindo das demais espécies pertencentes ao gênero *Malassezia*, anteriormente conhecido como *Pityrosporum* (INAMADAR; PALIT, 2003); sendo um habitante saprófita da superfície cutânea de animais, não patogênica em humanos (CAFARCHIA et al., 2007; 2011). Por ser de fácil obtenção e cultivo, e possuir grande distância filogenética quando comparada ao gênero *Leishmania*, a levedura *M. pachydermatis* mostrou-se uma ferramenta útil para a detecção de possíveis perdas de material genético durante o processo de extração, que antecede o diagnóstico molecular das leishmanioses.

3 JUSTIFICATIVA

Visando elucidar dúvidas em relação à detecção de *Leishmania* spp., o Serviço Regional de Referência em Leishmanioses (SRL) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, filiado à Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM / FIOCRUZ) Pernambuco - Brasil, fornece o diagnóstico de complexidade, controle de qualidade para os Laboratórios Centrais (LACENS) do Nordeste e treinamento de Recursos Humanos. A execução do diagnóstico de complexidade compreende na resolução de casos inconclusivos ou duvidosos, que já passaram pelas unidades municipais e estaduais onde não foi possível a determinação do diagnóstico final. Podem ser realizados diferentes ensaios, de acordo com a necessidade do médico solicitante, os quais incluem testes sorológicos, cultivo, exames parasitológicos e PCR (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2010).

Diante da competência atribuída ao SRL e levando-se em consideração os avanços da biologia molecular e as deficiências inerentes à tecnologia de PCR, objetivou-se desenvolver e padronizar ferramentas diagnósticas baseadas em multiplex PCR capazes de detectar pequenas quantidades do DNA do agente etiológico (*L. (V.) braziliensis* ou *L. infantum*), um controle da qualidade da amostra (gene para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de mamíferos – G3PD) e um controle do processo de extração (plasmídeo pUC18 ou DNA genômico de *M. pachydermatis*) na mesma reação. O desenvolvimento de ferramentas diagnósticas que permitem a avaliação da qualidade da amostra e controle de extração simultaneamente à detecção de *L. infantum* / *L. (V.) braziliensis* irá limitar ao máximo a possibilidade de erro na emissão do diagnóstico final de um paciente com leishmaniose, seja este animal ou humano, reduzir a possibilidade de falsos negativos e garantir a qualidade dos resultados. Adicionalmente, uma maior capacidade de monitoramento dos resultados poderá evitar eventuais repetições dos testes, reduzindo os custos operacionais.

A implementação de métodos diagnósticos rápidos e confiáveis permitirá o estabelecimento precoce do tratamento para o paciente, além da possibilidade de uma caracterização epidemiológica mais representativa, culminando num melhor direcionamento das medidas de controle que, a longo prazo, reduzirá o número de casos de leishmaniose tegumentar e visceral em regiões endêmicas.

4 PERGUNTA CONDUTORA E HIPÓTESE

4.1 Pergunta condutora

A inclusão de controles de qualidade interno e externo no diagnóstico molecular das leishmanioses promove maior acurácia à técnica de PCR?

4.2 Hipótese

Protocolos de multiplex PCR podem ser otimizados com a inclusão de alvos moleculares para o controle da qualidade amostral, aumentando a acurácia do diagnóstico molecular das leishmanioses.

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

Otimizar e avaliar ferramentas moleculares baseadas em multiplex PCR para detecção simultânea de regiões-alvo do kDNA de *Leishmania infantum* ou *L. (V.) braziliensis*, controle interno da reação (gene G3PD de mamíferos) e controle de extração (plasmídeo pUC18 ou DNA genômico de *M. pachydermatis*).

5.2 Específicos

- a) Otimizar reações de triplex PCR para o diagnóstico da LT e LV utilizando os sistemas desenvolvidos por Gonçalves e outros (2012), acrescidos do DNA genômico de *Malassezia pachydermatis* ou plasmídeo pUC18 como controles externos para o processo de extração;
- b) Determinar o alvo para controle externo com melhor adaptação para configurar os ensaios tríplex de diagnóstico;
- c) Avaliar o desempenho dos novos testes multiplex através de análise de concordância, comparando-os com protocolos de PCR e qPCR;
- d) Avaliar a aplicabilidade prática dos novos testes através de indicadores de validade clínica, em função de protocolos de PCR e qPCR.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo de validação de métodos diagnósticos, baseado em etapas sugeridas por Sackett e Haynes (2007), consistindo em três fases: I) Análise da reprodutibilidade dos testes em amostras sabidamente positivas e negativas e II) Análise da sensibilidade e especificidade clínicas e analíticas dos novos testes III) Análise estatística da concordância dos resultados dos novos testes com resultados de testes consagrados pela literatura em amostras de campo.

6.2 Amostragem

Foi adotada uma amostragem de conveniência (COSTA NETO, 1977; REIS, 2003).

Para as etapas iniciais do estudo (otimização e fase I) foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos residentes em áreas não endêmicas para as leishmanioses, que não receberam transfusão sanguínea e apresentaram diagnóstico negativo (PCR e qPCR) pelo SRL-FIOCRUZ/PE de acordo com Paiva-Cavalcanti et al., (2009; 2013) sendo estes definidos como controles negativos. As amostras sabidamente positivas (controles positivos) utilizadas nestas etapas foram obtidas pela adição de DNA genômico de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) ou *L. infantum* (MHOM/TN/1980/IPT1) ao DNA extraído de humanos ou cães saudáveis.

Para as fases II e III foram obtidas amostras de sangue de cães de áreas endêmicas para LT e LV, coletadas em atividades de campo do SRL-FIOCRUZ/PE.

6.3 Coleta de sangue

Para os pacientes definidos como controle negativo e cães incluídos no estudo, após antissepsia com algodão embebido em álcool etílico 70%, foram coletados de 2 - 5 mL de sangue, com auxílio de uma seringa de 5 mL acoplada a uma agulha 25x7 mm. O material foi armazenado em tubo contendo solução anticoagulante (EDTA 0,009 g/5 ml de sangue) e estocado em freezer a -80°C para posterior extração de DNA.

6.4 Considerações éticas

Os pacientes e/ou seus responsáveis, bem como os proprietários dos animais, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A), autorizando a utilização do material coletado para fins científicos.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ), Licença LW-41/10 (Anexo A). A referida proposta também foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do CPqAM/FIOCRUZ, parecer 42/2010 (Anexo B) registro no CAAE: 0041.0.095.000-10/0001.0.095.000-11.

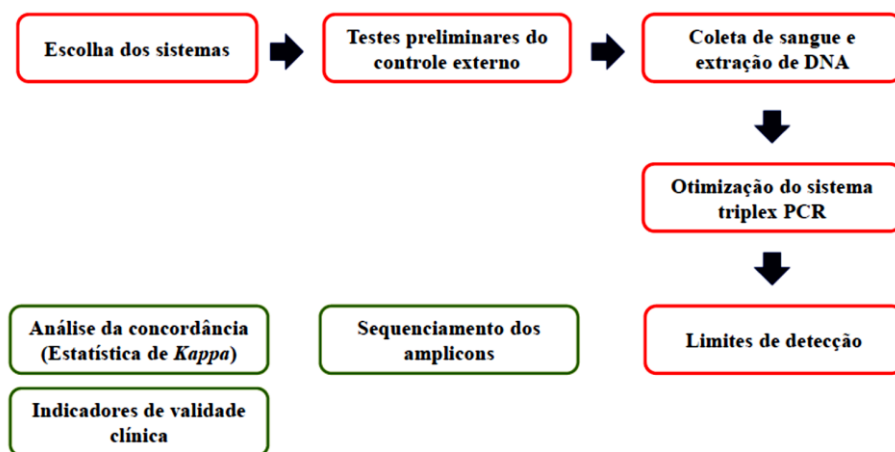
6.5 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue foi efetuada com o Illustra blood genomicprep mini spin Kit (GE Healthcare, New York, USA), seguindo as instruções do fabricante; as quais compreendem, basicamente, 03 etapas (lise de células, lavagem da mini coluna e eluição do DNA).

Para a determinação dos limites de detecção e testes em amostras, o DNA repórter foi adicionado após a lise das células, antes do processo de lavagem e precipitação de proteínas, para o controle das demais etapas do processo de extração.

O fluxograma de trabalho seguido para a otimização e avaliação dos novos testes de multiplex PCR está ilustrado na Figura 4, sendo detalhadas as etapas nos itens a seguir.

Figura 4- Fluxograma de trabalho seguido para a otimização e avaliação dos sistemas de multiplex PCR compostos para o diagnóstico da LT e LV.



6.6 Multiplex PCR convencional para o diagnóstico da LT

6.6.1 Escolha dos controles externos e desenho de *primers*

Com base em duas sequências de plasmídeos [GenBank: L08752 e L09136] – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), e com o auxílio do software *PRIMER BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) foram desenhados dois sistemas com capacidade de detecção para o plasmídeo comercial pUC18 (Boehringer Mannheim® - Brasil).

Como uma alternativa ao pUC18, testes utilizando DNA genômico de *Malassezia pachydermatis* (cepa CD 50; sequência no NCBI: C2/DQ915506) como controle de extração foram realizados. Foi utilizada como alvo para este sistema de controle externo a região ITS-1 (*internal transcriber spacer*) do DNA genômico de *M. pachydermatis*, que codifica para RNA ribossomal. Para sua detecção foram usados os *primers* 18SF1 e 5.8SR1, descritos por Carfachia e outros (2007).

6.6.2 Avaliação preliminar dos controles externos

Um teste inicial foi feito para avaliar o desempenho dos sistemas desenhados para detecção do pUC18. Neste experimento, a reação foi composta por uma amostra sem o plasmídeo (controle negativo sem adição de DNA - *no template control* - NTC) e outras três amostras contendo diferentes concentrações do pUC18. Após a avaliação inicial, um sistema foi escolhido para compor os ensaios da triplex PCR. Um teste similar foi posteriormente realizado para avaliar o funcionamento do controle externo alternativo - DNA genômico de *M. pachydermatis*.

Uma curva de diluição do plasmídeo foi construída para determinação do limite de detecção (de 0,5 fg/ μ L a 50 ng/ μ L, razão de diluição 1:10), utilizando uma concentração de 20 pmol/ μ L dos *primers*. Obtido o limite de detecção, várias concentrações dos *primers* foram testadas (entre 1 pmol/ μ L e 20 pmol/ μ L) para determinar a concentração de Pf (*forward*) e Pr (*reverse*) a ser incluída na reação mLTA (GONÇALVES et al., 2012) (Apêndice B). Um teste preliminar com os iniciadores para detecção de *M. pachydermatis* foi posteriormente realizado sob as condições de reação da triplex PCR otimizada com o plasmídeo pUC18.

Para determinação do limite de detecção pré-extração do DNA genômico de *M. pachydermatis* na reação tríplex, foi construída uma curva de diluição do DNA da levedura (de 1 fg/ μ L a 1 ng/ μ L, razão de diluição 1:10). Para obter as soluções com os três alvos, cada amostra da curva foi misturada com amostras de DNA humano já extraídas, sabidamente positivas para LT. Posteriormente, o limite de detecção foi determinado adicionando-se as diferentes concentrações do DNA da levedura durante o processo de extração de DNA em sangue total sabidamente positivo para LT, conforme descrito no Item 6.5.

6.6.3 Otimização do sistema tríplex PCR para LT

O sistema triplex formado foi testado em amostras sabidamente positivas e negativas para LT, mantendo-se as condições de ciclagem padronizadas por Gonçalves e outros (2012). Os *primers* B1/B2 (BRUIJN; BARKER, 1992) utilizados na mLTA para detectar *L. (V.) braziliensis* foram substituídos por oligonucleotídeos desenhados recentemente pela equipe para detectar com maior sensibilidade o parasito: kDNA1f [5'-ATGCCTCTGGGTAGGGGCGTTC-3'] e kDNA1r [5'-GGGAGCGCGGCCCACTATATT-3'] (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013). Os experimentos de otimização foram compostos pelas seguintes amostras: a) *Non Template Control* ou controle negativo sem amostra - NTC; b) amostra com o pUC18; c) DNA extraído de sangue sabidamente negativo para LT com pUC18; d) amostra com DNA de *L. (V.) braziliensis* e pUC18; e) DNA extraído de sangue sabidamente positivo para LT com pUC18; f) DNA genômico de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) como controle positivo.

A otimização da reação triplex foi efetuada por meio da análise dos resultados de interação entre os sistemas para detecção do pUC18, G3PD e KDNA1. Quando necessário, foram feitas modificações nas condições de ciclagem (temperaturas de anelamento e extensão), bem como alterações na quantidade e concentração dos reagentes. De modo semelhante, foi realizada a otimização da reação de PCR com DNA genômico de *M. pachydermatis* como controle externo. O limite de detecção do controle externo e do agente etiológico na reação tríplex foram determinados através da adição de 1 ng a 0,1 fg (diluição seriada fator 10) do DNA genômico de *M. pachydermatis* e *L. (V.) braziliensis*, respectivamente, a amostras de sangue sadio durante o processo de extração.

6.7 Multiplex PCR convencional para o diagnóstico da LV

6.7.1 Escolha do alvo

O controle externo escolhido para o diagnóstico da LV foi o DNA genômico de *M. pachydermatis*, conforme descrito no item 6.6.1.

6.7.2 Avaliação preliminar do controle externo

Um teste inicial foi realizado para avaliar o desempenho do sistema Mf / Mr na detecção de *M. pachydermatis* sob as condições de ciclagem da mLV (GONÇALVES et al., 2012), utilizando *primers* Mf / Mr a 5 pmol/μL. Após a avaliação inicial, o sistema foi incluído para compor os ensaios da tríplex PCR.

6.7.3 Otimização do sistema tríplex PCR para LV

O sistema tríplex formado foi testado em amostras humanas sabidamente positivas e negativas para LV, mantendo-se as condições padronizadas por Gonçalves e outros (2012). Este experimento foi composto pelas seguintes amostras: a) NTC; b) DNA extraído de sangue sabidamente positivo e negativo para LV; c) DNA extraído de sangue sabidamente positivo para LV com adição de DNA genômico de *M. pachydermatis*; d) DNA genômico de *L. infantum* (MHOM/TN/1980/IPT1) como controle positivo.

Um sistema tríplex para LV foi otimizado por meio da análise dos resultados de interação entre o sistema Mf / Mr, G3PD e LINF 1B (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009) e, por meio de modificações nas condições de ciclagem (temperaturas de anelamento e extensão), bem como alterações na quantidade e concentração dos reagentes. O limite de detecção do controle externo e do agente etiológico na reação tríplex foram determinados através da adição de 1 ng a 0,1 fg (diluição seriada fator 10) do DNA genômico de *M. pachydermatis* e *L. infantum*, respectivamente, a amostras de sangue sadio durante o processo de extração (item 6.5).

6.8 Sequenciamento dos produtos de PCR para confirmação da especificidade dos novos sistemas

Os produtos de PCR obtidos pelas reações padronizadas foram purificados e sequenciados, de acordo com o protocolo padrão do Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), utilizando o sequenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA. As sequências obtidas foram analisadas e editadas utilizando o software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), e comparadas com sequências similares disponíveis no GenBank, usando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

6.9 Análise e documentação dos resultados

Para avaliar a reprodutibilidade dos sistemas desenvolvidos foram efetuadas repetições intra e inter ensaio. Para tanto, durante a padronização, as amostras sabidamente positivas e negativas (conforme item 6.3) foram processadas em duplicatas, sendo o mesmo experimento repetido.

A interpretação e registro dos resultados dos testes de PCR e multiplex PCR foram efetuados por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (10 mg/mL), usando marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder - GibcoBRL-Life Technologies, USA ou Hind III - New England Biolabs, USA).

6.10 Avaliação da concordância entre novos testes e testes de referência

O diagnóstico duplo-cego das amostras coletadas em campo foi realizado por protocolos de PCR convencional (LINF 1B e kDNA1) e em tempo real (LINF 1B e kDNA1) - observador 1 - SRL-FIOCRUZ/PE, e pelos protocolos de tríplex PCR otimizados para LV (tLV) e LT (tLT) - observador 2 - experimentador do estudo.

A concordância entre os resultados dos sistemas LINF 1B e tLV e dos sistemas kDNA1 e tLT foi determinada pelo cálculo da estatística de *Kappa* com nível de significância 5% ($p < 0,05$), considerando-se o seguinte julgamento: $k = 0,0$, ruim; $0,0 \leq k \leq 0,20$, leve; $0,21 \leq k \leq 0,40$, moderada; $0,41 \leq k \leq 0,60$, boa; $0,61 \leq k \leq 0,80$, excelente e $0,81 \leq k \leq 1,00$,

perfeita concordância entre os testes (ROSNER, 2006). Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do software BioEstat 5.0.

6.11 Indicadores de validade clínica - sensibilidade, especificidade e eficiência

Os resultados dos protocolos desenvolvidos foram comparados com os testes de referência. Amostras concordantes entre estes testes foram consideradas como verdadeiras-positivas (VP) ou verdadeiras-negativas (VN). Resultados discordantes entre os protocolos foram considerados como falsos-positivos (FP) ou falsos-negativos (FN) pelos testes em análise. A sensibilidade (S), especificidade (E) e eficiência (ϵ) dos novos testes foram calculadas em quadro de contingência 2x2 (Quadro 1), onde: $S = VP / VP + FN$; $E = VN / VN + FP$ e $\epsilon = VP + VN / n$ (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010b).

Quadro 1. Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos pelos novos testes e o diagnóstico verdadeiro (testes de referência)

Novos Testes tLV / tLT	Resultado PCR e/ou qPCR	
	Positivo	Negativo
Positivo	VP	FP
Negativo	FN	VN

Fonte: A autora

Nota: tLT - tríplex para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar; tLV - tríplex para o diagnóstico da leishmaniose visceral; VP - verdadeiros positivos; FP - falsos positivos; VN - verdadeiros negativos; FN - falsos negativos.

7 RESULTADOS

7.1 Multiplex PCR convencional para o diagnóstico da LT

7.1.1 Escolha dos alvos e desenho dos *primers*

Para obter um sistema de controle externo adaptável à reação mLTA, foram desenhados dois pares de *primers*, (P1 e P2) com capacidade de detecção do plasmídeo comercial pUC18 (Boehringer Mannheim® - Brasil). Os produtos de amplificação dos dois sistemas possuem tamanhos distintos (Quadro 2).

O sistema de *primers* 18SF1 e 5.8SR1 (CAFARCHIA et al., 2007) foi escolhido como controle de extração alternativo por gerar um produto de 282 pares de bases, um tamanho adequado para compor as reações triplex. Além disso, a temperatura de anelamento dos *primers* (60°C) é semelhante àquela padronizada para a mLTA (63°C), compatível para o processo de padronização da reação com três alvos.

Quadro 2 - Sequências dos *primers* e tamanho dos produtos de amplificação dos sistemas desenhados para detecção dos controles externos.

Sistema	<i>Primers</i>	Sequência	Nº de pb
P1	P1f	5'- CGTAATAGCGAAGAGGCC - 3'	368
	P1r	5'- TAAGAAACCATTATTATC - 3'	
P2	P2f	5'- TTGTAAGTGGAGAGTGCAC - 3'	316
	P2r	5'- CAGGAAACAGCTATGAC - 3'	
Mf / Mr	18Sf1	5'- AGGTTTCCGTAGGTGAACCT- 3'	282
	5.8Sr1	5'-TTCGCTGCGTTCTTCATCGA - 3'	

Fonte: A autora.

Nota: pb - Pares de bases; f - *forward*; r - *reverse*

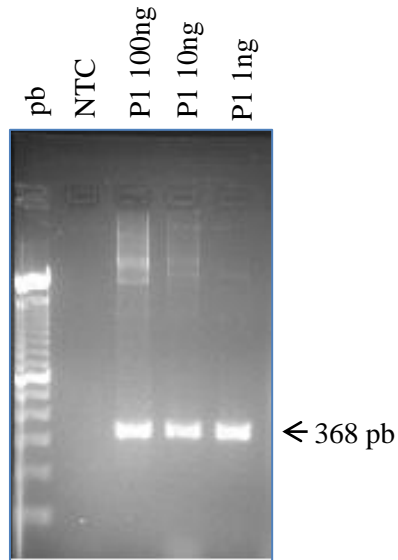
7.1.2 Avaliação preliminar dos controles externos

O experimento inicial para a avaliação dos sistemas de *primers* desenhados demonstrou um excelente desempenho de P1, tendo apresentado amplificação nas três concentrações testadas (Figura 5). O sistema P2 foi menos eficiente na amplificação do plasmídeo nas concentrações testadas (dados não mostrados).

O sistema de *primers* P1 foi o escolhido para compor os ensaios da triplex PCR para o diagnóstico da LT. O limite de detecção obtido por reação uniplex para as condições de ciclagem da mLTA foi de 10 pg de pUC18 por reação (25 µL) (Figura 6).

Mantendo o limite de detecção de 10 pg de pUC18, foi escolhida a concentração de 10 pmol/ μ L de P1f e P1r para ser adicionada na reação de mLTA a ser otimizada (Figura 7).

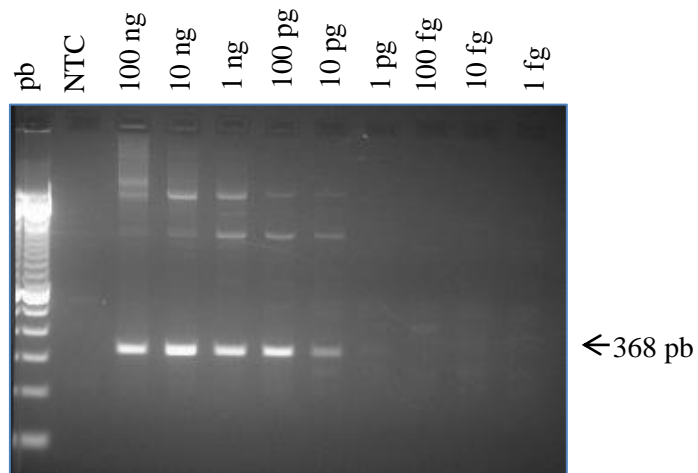
Figura 5 - Teste inicial do sistema de *primers* P1.



Fonte: A autora.

Nota: NTC - amostra sem DNA; As quantidades representadas na figura foram adicionadas ao volume final de 25 μ L da reação. O tamanho dos produtos foi determinado pelo marcador de peso molecular (pb) 100 Base-Pair Ladder DNA - GibcoBRL-Life Technologies, MD, USA

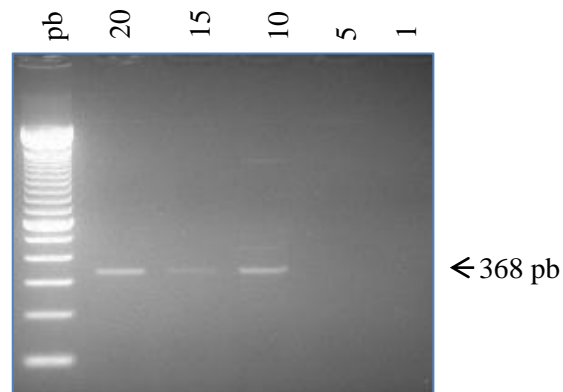
Figura 6 - Diluições decrescentes do plasmídeo comercial para determinação do limite de detecção.



Fonte: A autora.

Nota: Todas as quantidades de plasmídeo indicadas na figura foram adicionadas ao volume final de 25 μ L da reação de PCR. NTC: amostra sem DNA. O tamanho dos produtos foi determinado pelo marcador de peso molecular (pb) 100 Base-Pair Ladder DNA - GibcoBRL-Life Technologies, MD, USA.

Figura 7 - Determinação da concentração de P1f e P1r a ser incluída na reação de mLTA.

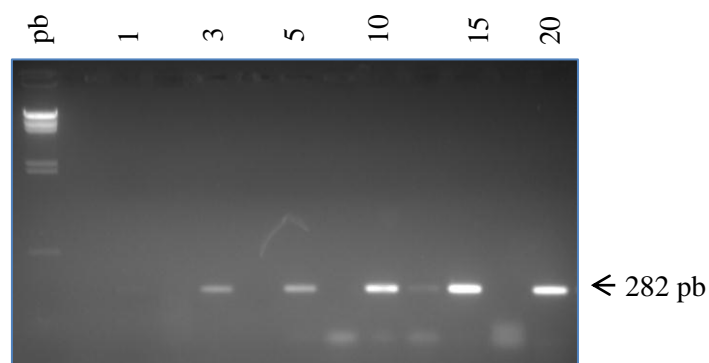


Fonte: A autora.

Nota: Concentrações representadas em picomoles de *primer* por microlitro. A concentração de 10 pmol/μL foi a menor capaz de detectar o plasmídeo a 10 pg por reação. O tamanho dos produtos foi determinado pelo marcador de peso molecular (pb) 100 Base-Pair Ladder DNA - GibcoBRL-Life Technologies, MD, USA.

A partir do teste preliminar o DNA genômico de *M. pachydermatis* (Figura 8), realizado sob as condições de reação da triplex PCR otimizada com o plasmídeo pUC18 (Quadro 3), pôde-se observar melhor performance do sistema Mf / Mr comparado ao P1. Houve amplificação do material genético da levedura a partir da concentração de 3 pmol/μL de cada *primer*, utilizando-se 1 ng de DNA por reação (25 μL).

Figura 8 - Teste inicial realizado com diferentes concentrações dos *primers* Mf / Mr (expressas na figura em unidades de picomoles por microlitro), nas condições de reação padronizadas para o sistema pUC 18.



Fonte: A autora.

Nota: NTC: amostra sem DNA. O tamanho dos produtos foi determinado pelo marcador de peso molecular (pb) λ DNA /Hind III (New England Biolabs, USA)

O limite de detecção do controle externo *M. pachydermatis* foi determinado após a padronização da triplex PCR, como demonstrado no item 7.1.3.

7.1.3 Otimização do sistema tríplex PCR para LT

Para melhorar a performance da reação de tríplex PCR com pUC 18 como controle de extração foi necessário o aumento da concentração de deoxinucleotídeos tri fosfatados (dNTPs), *Taq* polimerase, *primers* e cloreto de magnésio, em relação as condições de reação da mLTA, anteriormente padronizadas por Gonçalves e outros (2012). Após estas alterações, a reação tríplex PCR foi padronizada (Figura 9). As condições de reação e ciclagem definidas estão resumidas na Quadro 3. Mesmo após a obtenção da amplificação simultânea das três bandas com as configurações de reação padronizadas, foi observada ausência de reprodutibilidade inter e intra teste do sistema P1 em amostras positivas para o sistema kDNA1.

Quadro 3 - Condições de reação e ciclagem padronizadas para tríplex PCR para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar Americana com detecção simultânea de controles externo (gene G3PD de mamífero) e interno (pUC18).

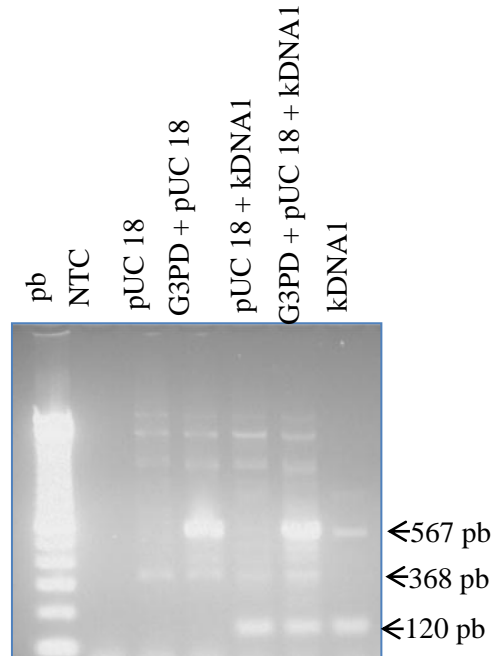
Componentes da Reação		Ciclagem
Água	5,5 µL	Desnaturação inicial: 94°C/5 min.
1x Buffer + MgCl ₂ 25 mM	6 µL	Desnaturação: 94°C/30 seg.
DNTPs 4mM	2,5 µL	Anelamento: 63°C/1 min.
kDNA1f (LTA) 2pmol/µL	2 µL	Extensão: 72°C/1min.
kDNA1r (LTA)	2 µL	Extensão final: 72°C/5min.
G1f (G3PD) 5pmol/µL	1 µL	Nº de ciclos: 35
G2r (G3PD)	1 µL	
P1f (pUC18) 20pmol/µL	1 µL	
P1r (pUC18)	1 µL	
Taq Polimerase (5U)	1 µL	
DNA teste	2 µL	
TOTAL:	25 µL	

Fonte: A autora.

Após o primeiro experimento preliminar com o sistema de controle externo Mf / Mr, três diferentes concentrações do sistema de *primers* 18SF1 e 5.8SR1 foram utilizadas para avaliar a eficácia em detectar o seu respectivo alvo, quando em conjunto com os outros dois sistemas (kDNA1 e G3PD), sob as condições de reação e ciclagem da tríplex PCR descritas na Quadro 3. Nenhuma alteração nas condições de reação e ciclagem da tríplex PCR foi

necessária para promover a amplificação do alvo (*L. (V.) braziliensis*) e de ambos os controles amostrais (Figura 10).

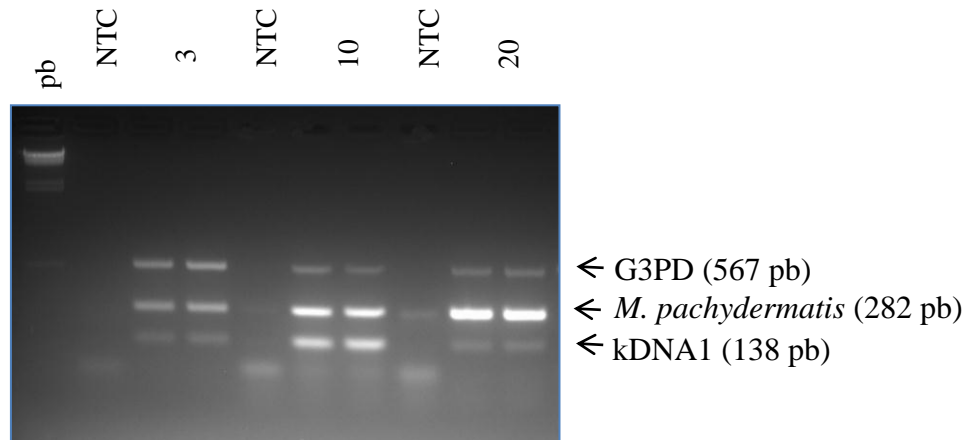
Figura 9 - Teste da reação triplex PCR para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar



Fonte: A autora.

Nota: Demonstração da amplificação simultânea do pUC18 (368 pb), do gene G3PD (controle interno - 567 pb) e do DNA de *Leishmania braziliensis* (138 pb). NTC: amostra sem DNA. O tamanho dos produtos foi determinado pelo marcador de peso molecular (pb) 100 Base-Pair Ladder DNA - GibcoBRL-Life Technologies, MD, USA.

Figura 10 - Amplificação simultânea dos três alvos da triplex PCR LT, utilizando DNA de *M. pachydermatis* como controle externo.



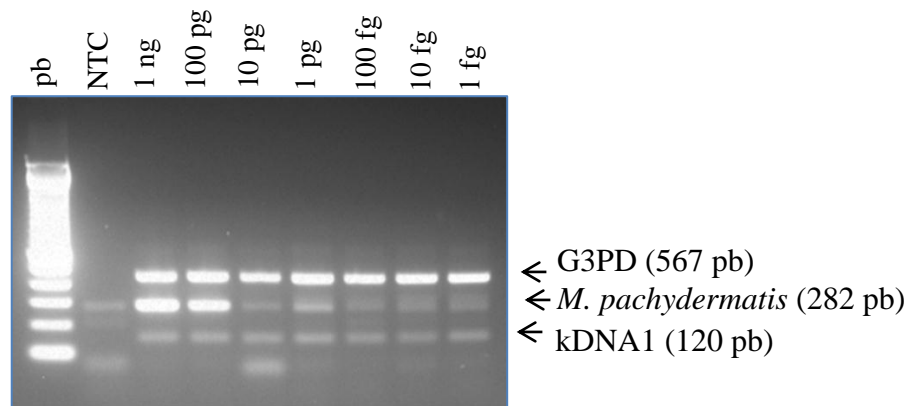
Fonte: A autora.

Nota: Os números referem-se às concentrações (em pmol / μ L) dos *primers* do controle externo (18SF1 e 5.8SR1). Um nanograma de DNA genômico de *M. pachydermatis* foi adicionado às amostras. O tamanho dos produtos foi determinado pelo marcador de peso molecular (pb) λ DNA /Hind III (New England Biolabs, USA).

Pelo desempenho apresentado no experimento acima, a concentração de 10 pmol/ μ L dos *primers* 18SF1 e 5.8SR1 foi escolhida para a determinação do limite de detecção do DNA genômico de *Malassezia* na reação triplex PCR. O experimento foi realizado sob as condições de reação e ciclagem descritas na Quadro 3, e demonstrou um limite de detecção do sistema de *primers* 18SF1 e 5.8SR1 de 1 fg de DNA de *M. pachydermatis* por reação (25 μ L), tendo havido também a amplificação simultânea dos outros dois alvos, em todas as concentrações da curva (Figura 11).

Foi determinado posteriormente o limite de detecção adicionando-se o DNA da levedura durante o processo de extração de DNA em sangue total sabidamente positivo para LT, após a etapa de lise das células. O material genético da levedura foi detectado até uma quantidade de 100 fg por reação (25 μ L), tendo ocorrido amplificação simultânea dos três alvos (Figura 11).

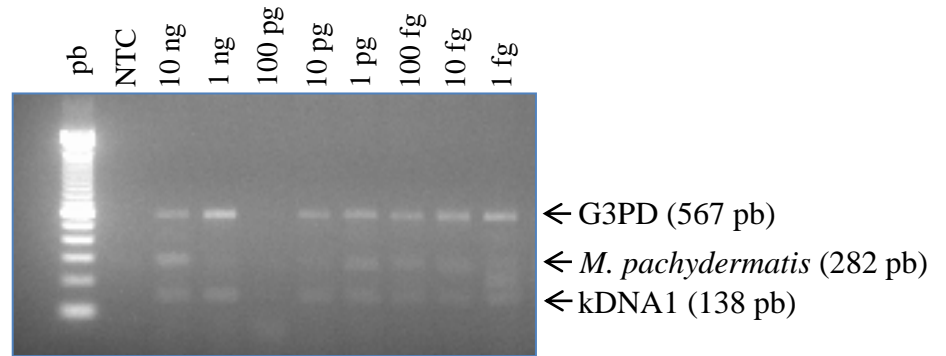
Figura 11 - Limite de detecção do controle externo *M. pachydermatis* na triplex PCR padronizada.



Fonte: A autora.

Nota: Quantidades de DNA genômico de *M. pachydermatis* por reação indicadas na figura. NTC: amostra sem DNA. O tamanho dos produtos foi determinado pelo marcador de peso molecular (pb) 100 Base-Pair Ladder DNA - GibcoBRL-Life Technologies, MD, USA.

Figura 12 - Limite de detecção do controle externo *M. pachydermatis* na triplex PCR pós-extração.

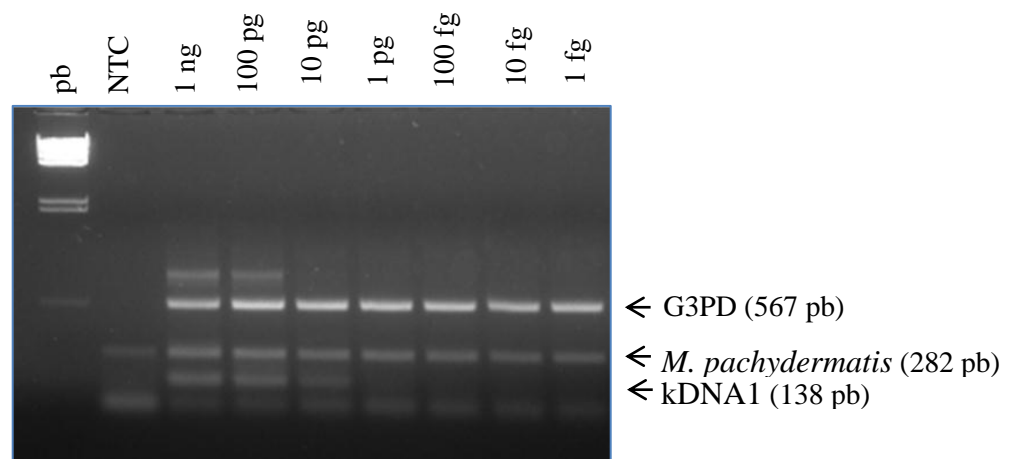


Fonte: A autora.

Nota: NTC: amostra sem DNA. O tamanho dos produtos foi determinado pelo marcador de peso molecular (pb) 100 Base-Pair Ladder DNA - GibcoBRL-Life Technologies, MD, USA.

Foi possível detectar o agente etiológico (*L. (V.) braziliensis*) na reação otimizada com quantidades mínimas de até 10 pg de DNA por reação (Figura 13), correspondendo a aproximadamente $4,5 \times 10^3$ parasitos por mililitro de sangue total.

Figura 13 - Limite de detecção de *L. (V.) braziliensis* na reação triplex otimizada.



Fonte: A autora.

Nota: NTC - *No template control*. As quantidades de DNA estão expressas por reação. O tamanho dos produtos foi determinado pelo marcador de peso molecular (pb) λ DNA /Hind III, New England Biolabs, USA.

Para a avaliação do novo sistema otimizado, amostras de pacientes obtidas pela equipe (Item 6.2) foram submetidas ao novo teste. Resultados da análise de concordância e indicadores de validade serão descritos no Item 7.3.

7.2 Multiplex PCR convencional para o diagnóstico da LV

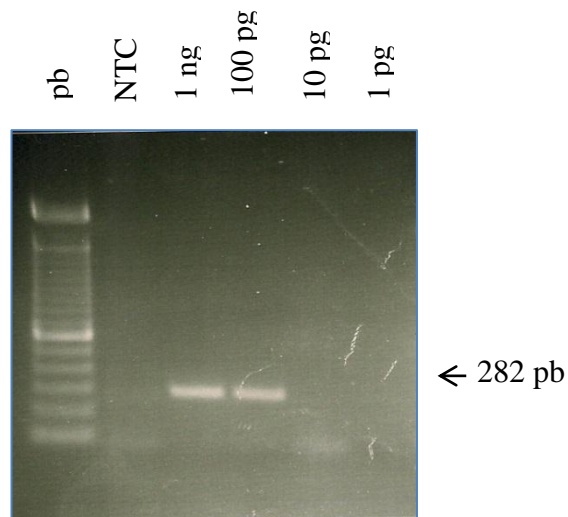
7.2.1 Escolha do alvo

Em virtude da boa performance apresentada pelo sistema de controle externo Mf / Mr no desenvolvimento da tríplex PCR para o diagnóstico da LT, este mesmo sistema foi escolhido para compor o ensaio tríplex para o diagnóstico da LV

7.2.2 Avaliação preliminar do controle externo

O sistema de controle externo escolhido apresentou amplificação de seu alvo no teste preliminar com as condições de reação propostas por Gonçalves e outros (2012) para o diagnóstico da LV, como mostra a figura abaixo (Figura 14). De acordo com este resultado, foi demonstrada a boa performance do sistema Mf / Mr nas condições de reação e ciclagem da mLV.

Figura 14 - Teste preliminar do sistema Mf / Mr para detecção do DNA genômico de *M. pachydermatis* como controle externo, nas condições de reação da mLV.



Fonte: A autora.

Nota: Quantidades de DNA genômico da levedura adicionadas a reação descritas na figura. O tamanho dos produtos foi determinado pelo marcador de peso molecular (pb) 100 Base-Pair Ladder DNA - GibcoBRL-Life Technologies, MD, USA.

7.2.3 Otimização do sistema tríplex PCR para LV

Amostras humanas sabidamente positivas e negativas para LV, com adição do controle externo (Item 6.5) compuseram os ensaios de otimização. Para a amplificação simultânea dos três alvos (Figura 15), foi necessário o aumento da concentração de MgCl₂ de 25 para 50 mM; Taq DNA polimerase de 5U para 10U por reação e redução da temperatura de anelamento para 60,3 °C. As configurações da reação padronizada estão descritas na Quadro 4.

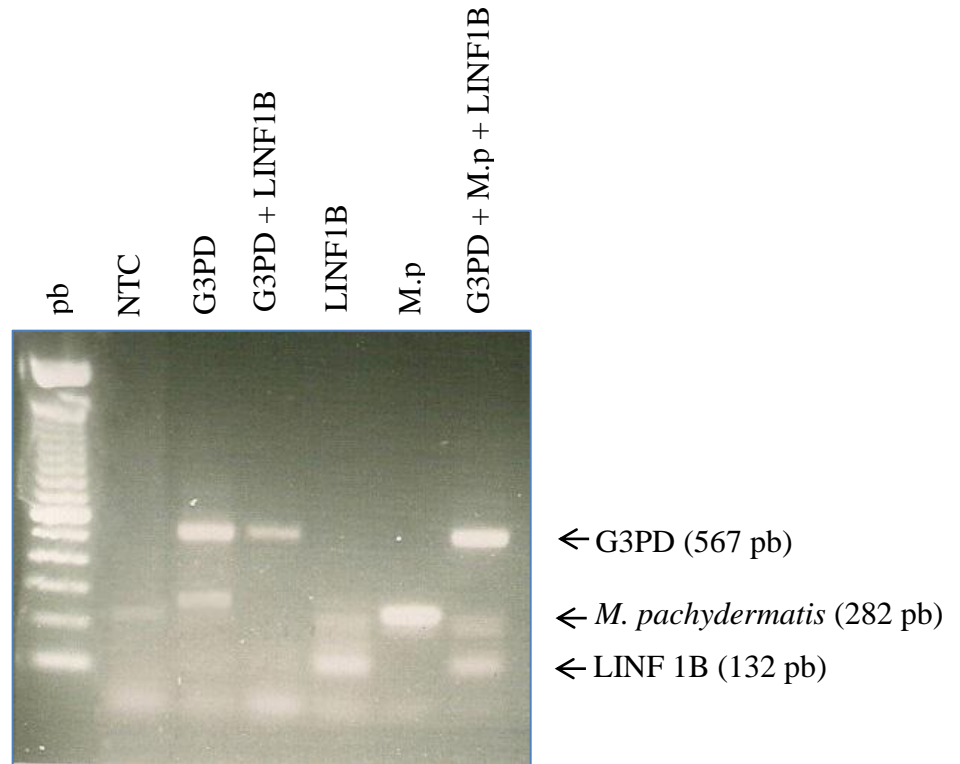
O controle externo demonstrou limite de detecção de 10 pg de DNA alvo na reação tríplex. Foi possível detectar o DNA de *L. infantum* até 1fg por reação, correspondendo a aproximadamente $2,7 \times 10^{-1}$ parasitos por mililitro de sangue (Figura 16).

Quadro 4 - Condições de reação e ciclagem padronizadas para triplex PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral com detecção simultânea de controles interno (gene G3PD de mamífero) e externo (*M. pachydermatis*).

Componentes da Reação		Ciclagem
Água	7,5 µL	Desnaturação inicial: 94°C/5 min.
1x Buffer + MgCl ₂ 50 mM	6 µL	Desnaturação: 94°C/30 seg.
dNTPs 2mM	2,5 µL	Anelamento: 60,3°C/1 min.
LINF1 23f (LV) 5pmol/µL	1 µL	Extensão: 72°C/1min.
LINF1 154r (LV)	1 µL	Extensão final: 72°C/5min.
G1f (G3PD) 1pmol/µL	1 µL	Nº de ciclos: 35
G2r (G3PD)	1 µL	
Mf (<i>M. p</i>) 5pmol/µL	1 µL	
Mr (<i>M. p</i>)	1 µL	
Taq Polimerase (5U)	1 µL	
DNA teste	2 µL	
TOTAL:	25 µL	

Fonte: A autora.

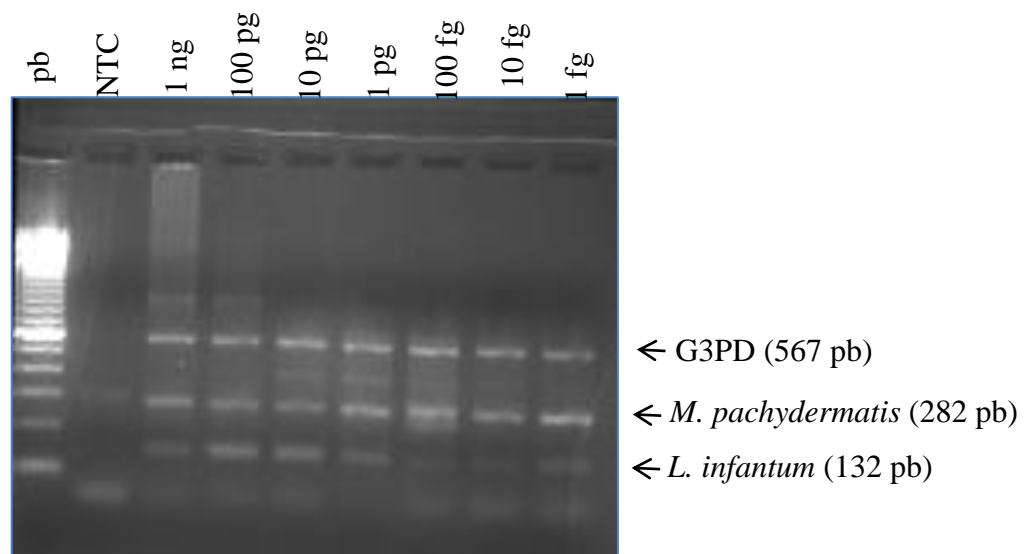
Figura 15 - Reação tríplice PCR padronizada, com amplificação simultânea do alvo (*L. infantum*) e controles interno (G3PD) e externo (M.p - *M. pachydermatis*).



Fonte: A autora.

Nota: NTC - amostra sem DNA. O tamanho dos produtos foi determinado pelo marcador de peso molecular (pb) 100 Base-Pair Ladder DNA - GibcoBRL-Life Technologies, MD, USA.

Figura 16 - Limite de detecção de *L. infantum* na reação tríplice otimizada.



Fonte: A autora.

Nota: NTC- *no template control*. PM – Padrão de peso molecular Marker λ DNA / Hind III (New England Biolabs, USA).

7.3 Confirmação da especificidade dos novos sistemas por sequenciamento de DNA

Amplicons obtidos com o conjunto de *primers* para o CI obtiveram elevada similaridade (75%) com uma sequência de G3PD ou GAPDH humano [GenBank: X01111.1]. As sequências dos amplicons gerados com o sistema P1, mostraram alta similaridade (100% de identidade) com o vetor de clonagem pUC18 [GenBank: L08752.1]. Altas similaridades (100% de identidade) foram também encontradas com outros vetores de clonagem [GenBank: JX069764.1; JQ927446.1; HQ207194.1; FJ389180.1] e com uma sequência de *Bacillus subtilis* [GenBank: CP002468.1]. A análise *in silico* dos *primers* 18SF1 e 5.8SR1 para a amplificação do CE não mostrou similaridade com seqüências do gênero *Leishmania*. Amplicons obtidos pelo protocolo kDNA1 demonstraram 94% de similaridade com a cepa *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 [GenBank: FR799010.1]. Amplicons obtidos por detecção do LINF 1B mostraram similaridade de 100% com uma sequência de *L. infantum* disponível no GenBank [Genbank: AF291093.1].

7.4 Avaliação das novas ferramentas para o diagnóstico da LV e LT

Os resultados das 186 amostras (88 para LT e 98 para LV) testadas pelo SRL-FIOCRUZ/PE, foram utilizados como padrão-ouro para a avaliação dos novos protocolos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010b): entre as amostras testadas, 45 foram positivas (PCR +: 44 / qPCR +: 1 / PCR e qPCR +: 45) e 43 negativas na PCR e qPCR para o kDNA1 (LT); 49 foram positivas (PCR +: 37 / qPCR +: 12 / PCR e qPCR +: 49) e 49 negativas pela PCR e/ou qPCR pelo protocolo LINF 1B (LV).

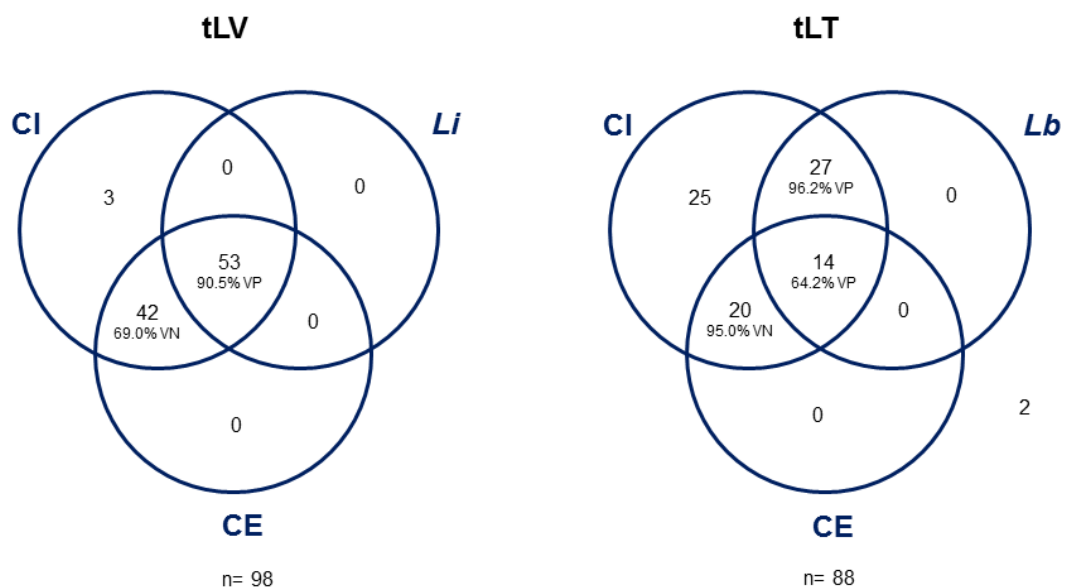
A tLT obteve resultado positivo para a presença de *L. (V.) braziliensis* em 41 das amostras testadas, e resultado negativo em 47. Foi observada ausência de amplificação do CE em 25 amostras, indicando possível perda de material durante o processo de extração. Duas das amostras testadas pela tLT não obtiveram positividade para nenhum dos alvos (CI e CE), indicando degradação e / ou perda do DNA amostral durante a extração.

Para a tLV, houve positividade para a presença de *L. infantum* em 53 amostras e negatividade em 45. Entre as 98 amostras testadas para LV, três não obtiveram amplificação do CE.

O resultado global encontrado para LV e LT demonstra a ocorrência de perda significativa de DNA durante o processo de extração em 28 das 186 amostras de campo analisadas.

A Figura 17 ilustra os conjuntos de resultados de positividade para os três alvos possíveis e os resultados encontrados entre as amostras testadas, sendo 88 para a reação tríplex para LT (tLT) e 98 para a reação tríplex para LV (tLV), e os percentuais de resultados concordantes e discordantes entre os testes de referência e os novos testes.

Figura 17. Conjuntos de resultados possíveis e positivities observadas para os três alvos entre as amostras de campo testadas pelos novos testes.



Fonte: A autora.

Nota: CI: controle interno (G3PD); CE: controle externo (*M. pachydermatis*); *Li*: *L. infantum* (LINF 1 B); *L.b*: *L. (V.) braziliensis* (kDNA1).

Os testes desenvolvidos demonstraram bom índice de concordância com o conjunto de resultados da PCR e qPCR (kDNA ou LINF 1 B), considerando-se todas as amostras testadas. Eliminadas as amostras que tiveram negatividade para o controle externo, houve melhora da concordância entre os testes para as reações tLT e tLV. O índice de *Kappa* calculado para a tLT e tLV versus testes de referência está descrito na Quadro 5.

Os parâmetros calculados utilizando o total de amostras e eliminando-se as amostras invalidadas pela ausência de amplificação do controle externo estão expostos na Quadro 5. Foi observada melhora da sensibilidade e especificidade com a eliminação das amostras impróprias, e equilíbrio entre ambos.

Quadro 5 - Índices de concordância e indicadores de validade clínica calculados para o total de amostras e amostras válidas, frente aos resultados de protocolos consagrados de PCR e PCR em tempo real.

tLV					
	Sensibilidade (S)	Especificidade (E)	Eficiência (ε)	Kappa (p valor)	Concordância
Total de amostras	73,46%	65,30%	69,38%	0,6252 (<0,0001)	Boa
Amostras válidas	78,68%	85,29%	81,05%	0,6012 (<0,0001)	Boa
tLT					
	Sensibilidade (S)	Especificidade (E)	Eficiência (ε)	Kappa (p valor)	Concordância
Total de amostras	77,77%	86,04%	81,81%	0,6601 (<0,0001)	Boa
Amostras válidas	78,26%	88,09%	82,95%	0,7845 (<0,0001)	Excelente

Fonte: A autora.

8 DISCUSSÃO

As melhorias contínuas feitas no âmbito do diagnóstico molecular (ex.: automatização) e a alta demanda por ferramentas diagnósticas rápidas e eficientes levou à redução dos custos da PCR, tornando-a um método mais acessível (LIVENGOOD; WRENN, 2001; YANG; ROTHMAN, 2004). Nos últimos anos, a PCR foi estabelecida como o método de preferência para o diagnóstico e identificação das espécies *Leishmania* spp., devido à sua maior sensibilidade e tempo curto de resposta, em comparação com alguns testes de diagnóstico tradicionais (ex.: cultura de protozoários) (TSUKAYAMA et al., 2013). Em acordo com esta tendência, o Serviço de Referência em Leishmanioses FIOCRUZ-PE (SRL) fornece o diagnóstico através de diferentes ensaios, que incluem a reação em cadeia da polimerase como principal método, além de testes sorológicos, cultivo e exames parasitológicos, realizando paralelamente pesquisas relacionadas à ecoepidemiologia das leishmanioses (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2010).

Assim como a sorologia e demais métodos diagnósticos, a reação em cadeia da polimerase é suscetível a resultados falso-positivos (ex.: devido à contaminação das amostras por DNA residual ou má manipulação) e falso-negativos (ex.: presença de inibidores da reação de PCR ou má performance do processo de extração). Para superar estas limitações esclarecer a presença de inibidores enzimáticos ou degradação do material genético na amostra em teste, genes constitutivos têm sido usados como controles internos para verificação da integridade do DNA (CASTILHO et al., 2008; GONÇALVES et al., 2012).

No intuito de melhorar a relação custo/benefício/tempo do diagnóstico das leishmanioses, foi proposto recentemente um ensaio de duplex PCR capaz de detectar um gene constitutivo como controle interno da reação (GONÇALVES et al., 2012). No referido trabalho, foi possível observar que amostras de pacientes com baixa carga parasitária as quais contém quantidades mínimas do DNA do agente etiológico, podem ser significativamente afetadas pela degradação ou perdas de DNA durante os processos que precedem o diagnóstico molecular. Este fato sugeriu a necessidade de incluir controles para monitorar possíveis falhas durante a etapa pré analítica mais crítica: a purificação do DNA. Para aperfeiçoar a capacidade diagnóstica da PCR, foram descritos no presente estudo dois protocolos de triplex PCR com inclusão de controles externos, desenvolvidos para monitoramento simultâneo de possíveis perdas durante o processo de extração de DNA, e eventual degradação do material durante o estoque pré-analítico das amostras.

Reações de multiplex PCR podem ajudar a economizar tempo e reduzir esforços em um laboratório de diagnóstico, sem comprometer a confiabilidade dos resultados. A amplificação preferencial de uma sequência-alvo em detrimento de outra é um fenômeno conhecido em PCRs multiplex que são desenhadas para amplificar mais do que um alvo em simultâneo (MUTTER; BOYNTON, 1995; POLZ; CAVANAUGH, 1998). A amplificação simultânea dos três alvos nos protocolos de tríplex PCR desenvolvidos foi obtida principalmente através da redução da temperatura de anelamento, como relatado por Elnifro e outros (2000).

Corroborando com as observações de Chamberlain e outros (1989), alterações na concentração de alguns reagentes foram necessárias para a amplificação eficiente dos controles interno e externo simultaneamente aos alvos *L. (V.) braziliensis* ou *L. infantum* nas reações tLT e tLV, respectivamente. A otimização desses componentes em PCRs multiplex que são projetadas para amplificação simultânea de múltiplos alvos pode ser benéfica (ELNIFRO et al., 2000). No entanto, de acordo com Elnifro e outros (2000) o aumento da concentração de reagentes como deoxi nucleotídeos tri fostatados (dNTPs), tampão e enzima contribui pouco para o aumento da sensibilidade e especificidade da reação e pode aumentar a probabilidade de anelamentos inespecíficos dos *primers* com posterior produção de produtos de amplificação espúrios. Conforme observado por Elnifro e outros (2000), o aumento de concentração destes reagentes foi capaz de provocar eventuais amplificações inespecíficas. Todavia, o tamanho dos fragmentos amplificados de cada par de *primers* é conhecido e sua especificidade foi demonstrada pela análise das sequências.

Durante os experimentos de otimização, foi observada falta de reprodutibilidade do sistema P1 em detectar o plasmídeo pUC18 em amostras positivas. Amostras com alta carga parasitária levam ao consumo precoce dos reagentes pela amplificação do DNA do agente etiológico, impedindo a detecção do DNA plasmidial. No entanto, o sistema P1 demonstrou boa reprodutibilidade em amostras negativas para *L. (V.) braziliensis*. Deste modo, o objetivo proposto foi alcançado, tornando-se um sistema útil para a avaliação diagnóstica, reduzindo as chances da liberação de resultados falso-negativos. A utilização do plasmídeo como controle de extração tem como vantagem a facilidade de obtenção em laboratórios de pesquisa em biologia molecular, onde têm sido amplamente explorados como vetores de clonagem, vacinas de DNA, vetores de terapia gênica e afins (OLIVEIRA; MAIRHOFER, 2013).

Em virtude da facilidade de obtenção e cultivo e grande distância filogenética em relação ao gênero *Leishmania* spp., o DNA genômico de *Malassezia pachydermatis* foi

selecionado como alvo alternativo para o controle de perdas na extração. Trata-se de uma levedura de fácil cultivo, caracterizada por não necessitar de suplementação lipídica; sendo um habitante saprófita da superfície cutânea de animais, e não patogênica em humanos, o que permite seu manuseio em nível 2 de biossegurança (BRASIL, 1995; CAFARCHIA et al., 2007; 2011). Com a perspectiva de validar os protocolos de triplex PCR para o diagnóstico de rotina, este controle externo foi preferencialmente trabalhado. O DNA de *M. pachydermatis* utilizado como controle externo mostrou-se eficiente quando adicionado durante o processo de extração, tendo apresentado bons limites de detecção sem, no entanto, impedir a amplificação simultânea do kDNA de *L. (V.) braziliensis* ou *L. infantum* e do controle interno.

Quando comparado ao P1, o par Mf / Mr apresentou melhor limite de detecção. A capacidade de detectar mínimas quantidades do controle externo se reflete na faixa de concentração do DNA alvo (*L. (V.) braziliensis* / *L. infantum*) que será garantida pelo controle externo. De acordo com os limites de detecção do CE observados, perdas iguais ou superiores a 100 fg (tLT) e 10 pg (tLV) de material genético de *Leishmania* spp. serão detectadas. De acordo com o manual do kit de purificação de DNA utilizado (Illustra Blood GenomicPrep minispin kit - GE Healthcare, USA), 20% a 30% do DNA total da amostra podem ser perdidos no suporte de afinidade durante a eluição do material.

Em procedimentos de diagnóstico, até mesmo perdas mínimas podem afetar significativamente a detecção do DNA do parasita, levando a conclusões diagnósticas incorretas (GONÇALVES et al., 2012). Neste contexto, estas novas ferramentas permitem uma melhor interpretação dos resultados da PCR e promovem a garantia de qualidade do diagnóstico das leishmanioses cutânea e visceral. Da mesma forma, uma vez que os kits comerciais são geralmente baseados em um princípio semelhante, o presente método pode ser usado para avaliar a qualidade do diagnóstico efetuado por diferentes laboratórios. Além disso, estes protocolos podem ser úteis para a avaliação de diferentes protocolos ou kits de extração, como demonstrado recentemente por Stoeckel e outros (2009), que avaliaram dois controles exógenos acrescidos e recuperados pós-extração para a detecção de DNA microbiano em água.

Considerando-se a prevista competição entre alvos em reações de PCR multiplex, é esperada uma menor sensibilidade analítica em comparação aos resultados de reações de alvo único. Apesar da concorrência entre os alvos, os protocolos otimizados demonstraram limite de detecção equivalente ou melhor do que protocolos uniplex encontrados na literatura para a

detecção dos mesmos parasitas. Este achado leva, por conseguinte, a um maior potencial para diagnóstico da infecção.

Disch e outros (2006) desenvolveram uma duplex PCR para detecção do complexo *L. donovani* com limite de detecção de 4,7 fg, inferior ao limite alcançado pela tLV que tem, no entanto, uma sequência alvo complementar (CE). Outro aspecto positivo da tLV é aumento do limite de detecção (1 fg) em relação ao LINF 1B (10 fg) (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009), apesar da presença de CI e CE na reação. De modo semelhante, a tCL mostrou melhor sensibilidade analítica do que o protocolo apresentado por Bruijn e Barker (1992), que é utilizado na rotina diagnóstica do SRL FIOCRUZ-PE, Brasil. Marcussi e outros (2008), apresentaram os iniciadores LBF1/LBR1 para a identificação de *L. (V.) braziliensis* com um limite de detecção de 50 ng de DNA na reação, o que está em contraste com o obtido com o ensaio triplex tCL (10 pg).

Além da maior capacidade de detecção dos agentes infecciosos, em ambos os ensaios de triplex, a relação custo/benefício é melhorada por garantir a qualidade dos resultados amostra-por-amostra, juntamente com a detecção simultânea de *Leishmania* spp. A realização de três PCRs em uma só mistura economiza reagentes e torna mais racional a decisão pela repetição de reações.

No que tange à validação de métodos diagnósticos, define-se como "padrão-ouro" o método ou conjunto de métodos que fornecem resultados classificados como inequívocos. Seu uso é um pré-requisito necessário para examinar a utilidade diagnóstica de qualquer teste (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010b; RODRÍGUEZ-CORTÉS, 2010). O critério inequívoco para determinar a infecção de um indivíduo por *Leishmania* spp. é o isolamento dos agentes etiológicos ou exame histopatológico (RODRÍGUEZ-CORTÉS, 2010). Todavia, apesar da alta especificidade dos métodos parasitológicos tradicionais, sua sensibilidade é baixa (SCHNUR; JACOBSON, 1987). Neste contexto, não há consenso sobre a disponibilidade de um padrão-ouro para a infecção por *Leishmania* (RODRÍGUEZ-CORTÉS, 2010).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2010b) na ausência de um padrão-ouro, padrões relativos de comparação são frequentemente necessários: a exemplo, ensaios sorológicos e animais vacinados podem ser utilizados como padrão de referência na validação de novos testes sorológicos. Obviamente, os cálculos de sensibilidade e especificidade são mais fidedignos quando um padrão-ouro estiver disponível, pois o erro nas estimativas do

padrão relativo será transferido para as estimativas do novo ensaio (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010b).

Embora até o momento nenhuma técnica de laboratório isolada ser aceita como o padrão-ouro para o diagnóstico da infecção por *Leishmania*, os resultados obtidos por PCR são significativos (MARQUES et al., 2006). Um estudo de Belli e outros (1998) demonstrou sensibilidade e especificidade de 100% da PCR quando comparada com a microscopia direta. Para o diagnóstico da forma cutânea, a PCR já tem sido considerada como o teste único mais confiável (FABER et al., 2003; LAWN et al., 2004; WEIGLE et al., 2002).

Neste cenário, o conjunto de resultados de protocolos de PCR e PCR em tempo real foi eleito como 'padrão-ouro' para os novos testes aqui desenvolvidos. A comparação entre resultados dos novos testes com protocolos de PCR já aceitos pela comunidade científica demonstra a equivalência de sua utilidade como métodos diagnósticos. Na ausência de consenso sobre a utilidade destas técnicas moleculares como testes de referência, foi adicionalmente realizada a análise de concordância pelo cálculo do índice de *Kappa*. Este dado pode fornecer suporte à análise dos indicadores de validade, uma vez que a ausência de um padrão-ouro perfeito pode causar dúvidas quanto a sua interpretação.

A aplicação das reações triplex em amostras de campo ilustrou claramente a importância do controle de perdas de DNA durante a execução de um diagnóstico molecular. Entre as amostras analisadas, 15,05% (28 entre 186) apresentaram amplificação do CI com negatividade para o CE, em decorrência de pobre recuperação de DNA na extração. Sendo assim, cerca de 1/6 das amostras não foram consideradas confiáveis para determinar o estado de infecção. Na prática diagnóstica, amostras sabidamente negativas com ausência de amplificação do CE seriam invalidadas, tornando-se necessária a repetição dos testes. Um aumento mais significativo na sensibilidade e concordância com os protocolos tradicionais de PCR foram observados nos resultados da tLT, onde maior número de amostras foram invalidado pela ausência do CI e / ou CE.

Entre as 41 amostras de LT verdadeiro-positivas, 25 (60,9%) não apresentaram amplificação CE. Este resultado ocorreu nas amostras com uma elevada carga parasitária, o que provavelmente levou ao consumo precoce de reagentes para a amplificação do DNA de *Leishmania*, tal como mostrado anteriormente (POLZ; CAVANAUGH, 1998).

Para o diagnóstico da LT, diferentes sensibilidades e especificidades têm sido demonstradas por ensaios de PCR com vários alvos moleculares (S = 91% e E = 100% para *Lb ITS1*, S = 98,7% e E = 53,8% para *kDNA*) (BENOUSSAN et al., 2006). A PCR para

kDNA é considerada o método mais sensível para o diagnóstico de leishmaniose, visto que há aproximadamente 10.000 minicírculos por parasita (DISCH et al., 2005) e, portanto, é útil para reações de diagnóstico. Em contraste com os protocolos avaliados por Benoussan e outros (2006), a tLT demonstrou especificidade satisfatória (79,16%), e equilibrada com alta sensibilidade (97,29%), utilizando o kDNA como alvo principal.

O equilíbrio entre sensibilidade e especificidade encontrados na avaliação tLV permite a aplicação da técnica proposta com diferentes propósitos na prática clínica. Um protocolo de PCR foi recentemente apresentado por Srivastava e outros (2011), com equilíbrio entre sensibilidade e especificidade (87,8% e 84%, respectivamente), quando utilizado em amostras coletadas em campo. O método aqui proposto é comparável (78,68% e 85,29%, respectivamente), apresentando a vantagem de uma melhor interpretação dos resultados da PCR. A boa concordância calculada entre tLT e tLV e os testes de referência indicou utilidade semelhante às reações uniplex, com a garantia da qualidade dos resultados negativos.

O correto diagnóstico e caracterização dos parasitos infectantes é essencial para a recomendação de tratamentos adequados, tanto para LT como para LV (GOTO; LINDOSO, 2010). Neste contexto, de acordo com a análise das sequências os sistemas de detecção escolhidos podem ser aplicados em várias áreas onde *L. infantum* e espécies do subgênero *Viannia* são encontradas, corroborando com os resultados obtidos para o LINF1B e kDNA1 em ensaios de qPCR (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009, 2013).

Os dois protocolos desenvolvidos neste estudo (tLT e tLV) podem ser aplicados com sucesso em serviços de diagnóstico de rotina no Brasil e em outras áreas onde LT e LV são endêmicas, oferecendo um diagnóstico rápido e preciso destas doenças negligenciadas em expansão. Diante do exposto, as ferramentas moleculares desenvolvidas representam a perspectiva de melhor capacidade de análise dos resultados, contribuindo para a garantia da qualidade no diagnóstico das duas formas de leishmaniose apresentadas. Além disso, espera-se que após etapas simples de padronização estes métodos possam ser aplicados ao diagnóstico de outras doenças infecciosas e parasitárias em laboratórios de referência para uso em diagnóstico e pesquisa.

9 CONCLUSÕES

As reações tríplex PCR otimizadas para o diagnóstico da LT e LV promovem a detecção simultânea de regiões-alvo do kDNA de *L. (V.) braziliensis* ou *L. infantum*, controle de qualidade da amostra (gene G3PD de diferentes mamíferos) e controle de extração (plasmídeo pUC18 ou DNA genômico de *M. pachydermatis*).

A inclusão de controles de qualidade internos e externos permite melhor interpretação dos resultados da PCR. Esta vantagem se reflete na melhora da sensibilidade e eficiência dos testes, conseqüentemente aumentando a utilidade da PCR para a determinação da infecção por *Leishmania* spp.

A comparação dos novos testes desenvolvidos com testes de PCR e qPCR consagrados pela literatura demonstrou equivalência entre os mesmos, permitindo aplicações com fins semelhantes na prática diagnóstica.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A implementação de ferramentas diagnósticas sensíveis e específicas que possam ao mesmo tempo avaliar a qualidade da amostra biológica (controle interno), e também detectar perdas mínimas do DNA do agente etiológico durante o processo de extração (controle externo), poderá reduzir a liberação de resultados falso-negativos para pacientes acometidos pelas formas visceral e tegumentar da leishmaniose.

Resultados produzidos com o máximo de confiabilidade em tempo reduzido permitirão um rápido início do tratamento de indivíduos infectados, reduzindo as chances de progressão da doença a uma fase sintomatológica grave.

A otimização de protocolos com capacidade quantitativa, com uso da qPCR e tecnologia TaqMan, torna-se necessária, com perspectiva de aplicação para pesquisas e monitoramento da resposta terapêutica. Neste sentido, será iniciado um trabalho de otimização e avaliação de protocolos de duplex PCR em tempo real para detecção específica de *L. infantum* e *L. (V.) braziliensis*, simultaneamente a um controle endógeno.

Como projeto integrado ao SRL do CPqAM, este estudo fortalece os objetivos da FIOCRUZ como Instituição de pesquisa, alinhando o desenvolvimento de tecnologias com a prestação de serviços à população brasileira.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F.G. et al. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. **BioTechniques**, Natick, v.33, p.1210–1214, 2002.
- AKHAVAN, A. A. et al. *Leishmania* species: Detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. **Experimental Parasitology**, New York, v. 126, n. 4, p. 552-556, 2010.
- ALM, E. W.; ZHENG, D.; RASKIN, L. The presence of humic substances and DNA in RNA extracts affects hybridization results. **Applied Environmental Microbiology**, Lion, v. 66, p. 4547-4554, 2000.
- ALVAR, J. et al. *Leishmaniasis* Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n.5, e35671, 2012.
- ANDRADE, B. B. et al. Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, Falácias e Perspectivas. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 75, n. 1, p. 75-82, 2005.
- ASHFORD, R.W. The *Leishmaniases* as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, Stuttgart, v.30, p. 269-1281, 2000.
- BAHK, Y. Y. et al. Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. **Proteomics**, Weinheim, v.4, p.3299-3307, 2004.
- BARKER, D. C. The Ultrastructure of kinetoplast DNA with particular reference to the interpretation of dark field electron microscopy images of isolated, purified networks. **Micron**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 21-62, 1980.
- BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, n.3, p. 328-337, 2004.
- BELLI, A. et al. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 58, p.102-109, 1998.
- BENSOUSSAN, E. et al. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, p. 1435–1439, 2006.
- BERG, E. S. et al. Reliability of the Amplicor™ internal control to disclose false-negative *Chlamydia trachomatis* PCR results. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 60, p. 125-129, 2005.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological Surveys confirm an increasing burden of cutaneous *Leishmaniasis* in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.93, p.488-494, 1999.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileiro Medicina Tropical**, Brasilia, v. 31, p. 575-578, 1998.

BRASIL. Secretaria de vigilância em saúde. **Guia de Vigilância epidemiológica. In: Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 2010a. 63p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8. ed., Brasília, 2010b.

BRASIL. Secretaria de vigilância em saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 2007. 182p.

BRASIL. Secretaria de vigilância em saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose visceral**, Brasília, 2006. 120p.

BREWSTER, S.; ASLETT, M.; BARKER, D.C. Kinetoplast DNA minicircle database. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 14, p. 437-438, 1998.

BREWSTER, S.; BARKER, D. C. Analysis of minicircle classes in *Leishmania (Viannia)* species. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, London, v. 96, p. 55-63, 2002.

BRITO, M. E. F. et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.45, n.4, p.425-429, 2012.

BRUIJN, M.; BARKER, D.C. Diagnosis of New World *Leishmaniasis*: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, Basel, v. 52, p. 45-58, 1992.

CAFARCHIA, C. et al. Advances in the identification of *Malassezia*. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 25, p. 1-7, 2011.

CAFARCHIA, C. et al. Molecular characterization of *Malassezia* isolates from dogs using three distinct genetic markers I nuclear DNA. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 21, p. 229-238, 2007.

CARVALHO, S. F. G. et al. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of brazilian visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 68, p.321-324, 2003.

CASTILHO, T. M. et al. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 78, p.122-132, 2008.

CHAMBERLAIN, J. L. et al. Detection screening of Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, London, v. 16, p.11141-11156, 1988.

CHAMBERLAIN, J. S. et al. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy, p. 272-281. In: GELFAND, D. H.; INNIS, M. A.; SHINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Academic Press, 1989.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 873-882, 2007.

CORTES, S. J. C. **Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal**. 163 p. Tese (Doutorado) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 2008.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977.

COSTA, L. M. C. **Leishmaniose tegumentar americana: uso de técnicas da biologia molecular no diagnóstico de infecção de roedores de coleção do Museu Nacional**, 1999. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz . Rio de Janeiro, 1999.

CRUZ, I., M. A. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. **Lancet**, London, v. 359, p. 1124-1125, 2002.

CUBA-CUBA, C. A. et al. A focus of mucocutaneous *Leishmaniasis* in Três Braços, Bahia, Brazil: characterization and identification of *Leishmania* stocks isolated from man and dogs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 79, p. 500-507, 1985.

CUBERO, J. et al. An internal control for the diagnosis of crown gall by PCR. **Journal of Microbiological Methods**, Oxford, v. 51, p. 387-392, 2002.

DISCH, J. et al. *Leishmania* (*Viannia*) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, Washington, v. 51, p. 185, 2005.

DISH, J. et al. Single-step duplex kDNA-PCR for detection of *Leishmania donovani* complex in human peripheral blood samples. **Diagnostic microbiology and infectious diseases**, Washington, v. 56, p.395-400, 2006.

DONOSO, O. M. et al. Quality control assessment for the PCR diagnosis of tick-borne encephalitis virus infections, **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 73-77, 2007.

DOURADO, Z. F. et al. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (RK39). **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 3, p. 205-214, 2007.

DUXBURY, R. E.; SADUN, E. H. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 13, p. 525-529, 1964.

ELFRINO, E. M. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, p. 559-570, 2000.

FABER, W. R. et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 49, p.70-74, 2003.

FISA, R. et al. Nested PCR for diagnosis of canine *Leishmaniasis* in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 99-2, p. 105-111, 2002.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, p. 214-221, 2006.

FRANK, E. Funding the public health response to terrorism. **BMJ**, London, v. 9, p. 331-378, 2005.

GALATI, E. A. B. Phylogenetic systematic of phlebotominae (Diptera: psychodidae) with emphasis on American Groups. **Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental**, Maracay, v.35, p.133-142, 1995.

GARCIA, A. L. et al. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. **Infectious Genetic and Evolution**, Oxford, v. 5, p.109-116, 2005.

GEHA, D. J. et al. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, p. 1768-1772, 1994.

GENARO, O. **Parasitologia Humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

GILL, G.; BEECHING, N. Visceral Leishmaniasis. In_____. **Tropical Medicine**, 6th ed. San Francisco: Wiley Online, 2009. Disponível:
<<http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/>>. Acesso em: 20 out. 2012.

GILSBACH, R. et al. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real time PCR data. **BioTechniques**, Natick, v. 40, p. 173-177, 2006.

GOMES, A. C.; NEVES, V. L. F. C. The strategy and prospects for the control of cutaneous *Leishmaniasis* in the State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 6, p. 553-558, 1998.

GONÇALVES, S. C. et al. Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of *Leishmaniasis*. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, São Paulo, v. 8, p. 188-197, 2012.

GONTIJO, B.; DE CARVAHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n.3, p. 338-349, 2004.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Reviews in Anti-infective Therapy**, Stuttgart, v. 8, p. 419-433, 2010.
- HOORFAR, J. et al. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 5, p. 1863-1868, 2004.
- HOTEZ, P. J. et al. Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v.38, p.871-878, 2004.
- INAMADAR, A. C.; PALIT, A. The genus *Malassezia* and human disease. **Indian Journal of Dermatologist, Venereologists and Leprosists**, New Delhi, v. 69, n.4, p. 265-270, 2003.
- IKONOMOPOULOS, J. et al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the propose assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 113, p. 99-113, 2003.
- KAR, K. Serodiagnosis of *Leishmaniasis*. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v.21, n.2, p.123-152, 1995.
- LAINSON, R. The American *Leishmaniases*: some observations on their ecology and epidemiology, review. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, London, v. 77, p. 569-596, 1983.
- LAMBSON, B.; BARKER, D. C. Homologous minicircles in *Leishmania donovani*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 96, n. 1, p. S75-S80, 2002.
- LAWN, S. D. et al. New world mucosal and cutaneous leishmaniasis: an emerging health problem among British travelers. **QJM**, Oxford, v. 97, p.781-788, 2004.
- LEBLANC-MARIDOR, M. et al. Quantification of *Campylobacter* spp. in pig feces by direct real-time PCR with an internal control of extraction and amplification. **Journal of Microbiological Methods**, Oxford, v. 85, p. 53-61, 2011.
- LEMIRANI M. et al. PCR detection of *Leishmania* in skin biopsies. **The Journal of Infection in Developing Countries**, Alghero, v. 3, p. 115-122, 2009.
- LIVENGOOD III, C. H.; WRENN, J. W. Evaluation of COBAS AMPLICOR (Roche): accuracy in detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by coamplification of endocervical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 39, p. 2928-2932, 2001.
- LÓPEZ-CÉSPEDES, A. et al. *Leishmania* spp. Epidemiology of Canine Leishmaniasis in the Yucatan Peninsula. **The Scientific World Journal**, Boston, 2012. No prelo.

- LUND, M.; MADSEN, M. Strategies for the inclusion of an internal amplification control in conventional and real time PCR detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 20, p. 92-99, 2006.
- MAIA-ELKHOURY et al. Analysis of visceral leishmaniasis reports by the capture-recapture method. **Revista de saúde pública**, Salvador, v. 41, n. 6, p. 2-6, 2007.
- MARCUSSI, V. M. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: New primers for identification using polymerease chain reaction. **Experimental Parasitology**, New York, v. 120, p. 300-305, 2008.
- MARQUES, M. J. et al. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 54, p. 37-43, 2006.
- MARY, C. et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.42, n.11, p. 5249-5255, 2004.
- MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthroponosis and Possibilities for Their Control. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p.359-375, 1994.
- MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 63, p. 82-102, 1992.
- MARZOCHI, M. C. A.; MARSDEN, P. P. Ecologia e controle de vetores -Leishmanioses. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SAÚDE E MEIO AMBIENTE, 1991, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Fiocruz, 1991. p. 31-36.
- MATEUS, R. P. et al. Caracterização preliminar do espaçador interno transcrito-1 its-1 do DNA ribossômico nas espécies do *Cluster buzzatii* de *Drosophila* (Diptera: drosophilidae). **Ambiência Guarapuava**, Campinas, v.2, n.1, p. 89-96, 2006.
- MAUBON, D. A One-step multiplex PCR for acanthamoeba keratitis diagnosis and quality samples control. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St Louis, v. 53, n. 6, p. 2866-2867.
- MAURICIO, I. L. et al. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, p.188-189, 2000.
- MEREDITH, S. E. O. et al. Development and application of the polymerase chain reaction for the detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical material. **Archives of the Institut Pasteur in Tunisia**, Paris, v.70, p. 419-431, 1993.
- MICHALSKY, E. M. et al. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.44, n. 5, p. 255-259, 2002.

MORALES, M. A. et al. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, p. 104-107, 2001.

MUMY K. L.; FINDLAY R. H. Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative-competitive PCR. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 57, p. 259-268, 2004.

MURPHY, N. M. et al. Construction and evaluation of a microbiological positive process internal control for PCR-based examination of food samples for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 120, p. 110-119, 2007.

MUTTER, G. L.; BOYNTON, K. A. PCR bias in amplification of androgen receptor alleles, a trinucleotide repeat marker used in clonality studies. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, p.1411-1418, 1995.

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES (Estados Unidos) **Leishmaniasis Life Cycle**. Bethesda, 2008. Disponível em: <<http://www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis/pages/lifecycle.aspx>>. Acesso em: 23 set. 2011.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

NOYES, H. A. et al. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 36, p. 2877-2881, 1998.

NOYES, H. A. Implications of a neotropical origin of the genus *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, p. 657-663, 1998.

OLIVEIRA, P. H.; MAIRHOFER, J. Marker-free plasmids for biotechnological applications – implications and perspectives. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 31, n. 9, p. 539-547, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **World Health Report 2000**. Health Systems: Improving Performance. Geneva, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Expert Committee on the Control of *Leishmaniasis*. **Control of the Leishmaniasis**. Geneva, 2010a. p. 22-26.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE: World Organization for Animal Health (OIE) Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In_____. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals OIE**. Geneve, 2010b. p. 1-18.

PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Gestão da Qualidade: Implementação no Serviço de Referência em Leishmaniose de Pernambuco – Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiania, v. 39, n. 2, p. 21-32, 2010.

PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. **Molecular and Cellular Probes**, London, 2013. No prelo.

PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* in canine blood. **The Veterinary Journal**, Oxfordshire, v. 182, n.2, p. 356-358, 2009.

PASSOS, V. M. A. et al. American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment. **Bulletin of World Health Organization**, Geneve, v.78, p. 968-974, 2000.

PISCOPO, T. V.; MALLIA, A. C. Leishmaniasis (review). **Postgraduation Medicine Journal**, Boca Raton, v.82, p.649–657, 2006.

POLZ, M. F.; CAVANAUGH, C. M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. **Applied Environmental Microbiology**, Lion, v. 64, p. 3724-3730, 1998.

RADSTROM, P. et al. Strategies for overcoming PCR inhibition, p. 149–161. In: DIEFENBACH, C. W.; DVEKSLER, C. S. (Ed.). **PCR primer: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.

RAY, D. S. Kinetoplast DNA minicircles: high-copy-number mitochondrial plasmids. **Plasmid**, New York, v. 17, n. 3, p. 177-190, 1987.

REA, S. et al. Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. **Journal of dairy research**, London, v. 68, p. 689-698, 2001.

REIS, J. C. **Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária**. Rio de Janeiro: Ed. Olinda, 2003.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous Leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, Washington, v. 7, p. 581-596, 2007.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular Diagnosis of *Leishmaniasis*: Current Status and Future Applications. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2007.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. et al. *Leishmania* Infection: Laboratory Diagnosing in the Absence of a “Gold Standard”. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 82, n. 2, p. 251-256, 2010.

ROSNER, B. **Fundamentals of Biostatistics**. 6. ed. Boston: Duxbury Press, 2006.

SACKETT, D. L.; HAYNES, R. B. Evidence base of clinical diagnosis: The architecture of diagnostic research. **BMJ journals**, Oxford, v. 324, p. 539-541, 2002.

SCHNUR, L. F.; JACOBSON, R. L. Appendix III. Parasitological techniques. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, M. (Ed.). **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. New York: Academic Press, 1987. p. 499-542.

SCHONIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v.47, p. 349–358, 2003.

SHAW, J. J. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. *Leishmaniasis* in Brazil X. Some observations on intradermal reaction to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous *Leishmaniasis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 69, p.323, 1975.

SHAW, J.; GRIMALDI, G.; CUPOLILLO, E. Identificação de *Leishmania*. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. v. 1, p. 733-737.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annual review of microbiology**, London, v. 41, p. 363–382, 1987.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (Brasil). **Leishmaniose visceral**: Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2011/d0205.def>>. Acesso em: 2 set. 2013.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 147, p. 315-319, 2007.

SRIVASTAVA, P. et al., Unusual Case of Resistance to Amphotericin B in Visceral Leishmaniasis in a Region in India Where Leishmaniasis Is Not Endemic. **Journal of clinical microbiology**, Amsterdam, v. 49, n. 8, p. 3088–3091, 2011.

STOCKDALE, L.; NEWTON, R. A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n.6, p.e2278, 2013.

STOECKEL, M. D. et al. Evaluation of two spike-and-recovery controls for assessment of extraction efficiency in microbial source tracking studies. **Water Research**, Oxford, v. 43, p. 4820-4827, 2009.

STRAUSS-AYALI, D. et al. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, p.1729-1733, 2004.

SUNDAR S. Diagnosis of Kala-azar – An Important Stride. **JAPI**, Bombay, v. 51, p. 753-754, 2003.

SUNDAR, S. et al. Immunochromatographic strip-test detection of anti-K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine Parasitology**, Amsterdam, v. 96, n. 31, p. 19-23, 2002.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical Diagnosis Laboratorial Immunology**, New York, v. 9, p. 951-958, 2002.

THELLIN, O. et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, Boston, v. 75, p. 291-295, 1999.

TSUKAYAMA, P. et al. A FRET-based real-time PCR assay to identify the main causal agents of new world tegumentary leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n.1, e1956, 2013.

VAN EYS, G. J. J. M. et al. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. **Molecular Biochemistry and Parasitology**, Bruxelles, v. 51, p. 133-142, 1992.

VIEIRA, J.; MESSING, J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. **Gene**, London, v. 19, n.3, p.259–268, 1982.

WEIGLE, K. A. et al. PCR based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 601-606, 2002.

XAVIER, M. A. S. et al. New vectors derived from puc18 for cloning and thermal-induced expression in *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 778-781, 2009.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. **The Lancet**, London, v. 4, p.337-348, 2004.

YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J.; MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. **Gene**, London, v. 33, n. 1, p. 103–119, 1985.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. **Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)**. Gainesville: Associated Publishers, 1994.

APÊNDICE A - Termos de Consentimento Livre e Esclarecido



Departamento de Imunologia, CPqAM/FIOCRUZ



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto: Padronização de PCR multiplex e PCR multiplex em tempo real para o diagnóstico das Leishmanioses

Eu, _____, RG _____, aceito participar desse estudo, cujo objetivo é desenvolver um método de diagnóstico para as leishmanioses. Fui informado que serei submetido à coleta de sangue para os testes de diagnóstico da leishmaniose visceral / leishmaniose tegumentar americana no estudo acima referido, sem que haja nenhum dano à minha saúde. Durante a assinatura deste termo fui esclarecido acerca dos benefícios desse estudo, que contribuirá para a detecção precoce desta doença e, conseqüentemente, rápida instituição da terapia . Fui informado ainda, que os materiais coletados serão incorporados ao Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, podendo ser utilizados em pesquisas posteriores; e que tenho plena liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão por tal. Estou ciente que não haverá nenhum incentivo financeiro para participação nesta pesquisa.

Contatos: **Dr^a. Milena de Paiva Cavalcanti, CPqAM/FIOCRUZ – Tel. (81) 2101-2679**

Assinatura

Recife, ____/____/____



Departamento de Imunologia, CPqAM/FIOCRUZ



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto: Padronização de PCR multiplex e PCR multiplex em tempo real para o diagnóstico das Leishmanioses

Eu, _____, RG _____,

_____, proprietário do animal _____,

espécie _____ aceito participar desse estudo, cujo objetivo é desenvolver

um método de diagnóstico para as leishmanioses. Fui informado que meu animal

será submetido à coleta de sangue para os testes de diagnóstico da leishmaniose

visceral / leishmaniose tegumentar americana no estudo acima referido, sem que

haja nenhum dano à saúde do mesmo. Durante a assinatura deste termo fui

esclarecido acerca dos benefícios desse estudo, que contribuirá para a detecção

precoce desta doença e, conseqüentemente, rápida instituição da terapia . Fui

informado ainda, que os materiais coletados serão incorporados ao Laboratório de

Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu

Magalhães/FIOCRUZ, podendo ser utilizados em pesquisas posteriores; e que tenho

plena liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de

penalização ou pressão por tal. Estou ciente que não haverá nenhum incentivo

financeiro para participação nesta pesquisa.

Contatos: **Dr^a. Milena de Paiva Cavalcanti, CPqAM/FIOCRUZ – Tel. (81) 2101-2679**

Assinatura

Recife, ____ / ____ / ____

APÊNDICE B - Artigo relacionado publicado no período



The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases
ISSN 1678-9199 | 2012 | volume 18 | issue 2 | pages 188-197

ORIGINAL PAPER

Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of leishmaniasis

Gonçalves SC (1), Régis-da-Silva CG (1), Brito MEF (1), Brandão-Filho SP (1), Paiva-Cavalcanti M (1)

(1) Department of Immunology, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco State, Brazil.

Abstract: Leishmaniasis is a neglected disease endemic in five continents. It is a severe disease that may lead to death, and its early detection is important to avoid severe damage to affected individuals. Molecular methods to detect *Leishmania* are considered alternatives to overcome the limitations presented by conventional methods. The aim of this study was to develop multiplex PCR systems able to detect small amounts of target DNA of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*, and the gene coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PD) in mammals, enabling quality evaluation of the sample simultaneously with detection of the specific target. The systems created for G3PD recognition were combined with detection systems for *L. infantum* and *L. braziliensis* to compose multiplex PCR systems for visceral (mVL) and cutaneous (mACL) leishmaniasis diagnosis. The multiplex PCR systems developed were assessed in blood samples from five different species of mammal reservoirs involved in the disease cycle in Brazil, and 96 and 52 human samples from patients with suspected visceral leishmaniasis (VL) and cutaneous leishmaniasis (ACL), respectively. Three G3PD detection systems were created (G3PD1, G3PD2 and G3PD3) with different product sizes, G3PD2 was chosen for the formation of multiplex PCR systems. The two multiplex PCR systems (mVL and mACL) were reproducible in all species evaluated. Results of test samples (sensitivity, specificity and efficiency) suggest its use in routine diagnosis, research activities in medicine and veterinary medicine. Additionally, the systems designed to detect the G3PD gene are capable of combining with other targets used for molecular diagnosis of infectious diseases. Concerning leishmaniasis, the multiplex PCR systems can be used in epidemiological studies for the detection of new and classic reservoirs, which may contribute to the reliability of results and development of actions to control the disease.

Key words: leishmaniasis, diagnosis, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, quality control.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is a vector-borne disease that is caused by obligate intramacrophage protozoa (family Trypanosomatidae, order Kinetoplastida). It is a neglected disease, endemic in rural areas of five continents and is the third most important vector-borne disease in the world (1). The annual incidence is about 1.5 to 2 million cases worldwide, with up to 350 million people at risk of infection

(2). There are an estimated 500,000 new cases of visceral leishmaniasis (VL) and more than 50,000 deaths from the disease each year (3). Such death rate is surpassed, among parasitic diseases, only by malaria (4).

There are at least 20 species of *Leishmania*, which may cause different clinical diseases. The prevalence of *Leishmania* spp. infection varies according to geographical distribution (5). VL is caused by *L. donovani* complex that consists

of *Leishmania (Leishmania) infantum* syn. *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Leishmania (Leishmania) donovani* (6). American cutaneous leishmaniasis (ACL) is caused by species of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana* complexes (7, 8). In Brazil, *L. infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* are the most common species isolated from VL and ACL carriers, respectively (7).

Early diagnosis and treatment are important as individual and community control measures. Untreated patients can act as reservoirs and contribute to the anthroponotic transmission (8). The clinical signs and symptoms are not pathognomonic for VL or ACL, and may be confused with other similar conditions such as malaria, tropical splenomegaly, schistosomiasis or cirrhosis with portal hypertension, African trypanosomiasis, milliary tuberculosis, brucellosis, typhoid fever, bacterial endocarditis, histoplasmosis, malnutrition, lymphoma, leukemia and numerous primary and secondary skin diseases (9).

The conventional routine diagnosis of leishmaniasis requires microscopic demonstration of *Leishmania* amastigotes in aspirates from spleen tissue, scraped skin smears, or in bone marrow. Blood culture is also commonly used (10). However, these conventional methods of diagnosis do have some limitations (11). Microscopic examination has low sensitivity and requires invasive samples (bone marrow, spleen, liver), whereas culture is susceptible to contamination and is time-consuming. Serological methods may be useful, but have problems with cross-reactions and differentiation between current and past infections, furthermore they are not accurate in immunosuppressed patients (12-16).

In the past ten years, the molecular biology has become increasingly relevant to the diagnosis and control of infectious diseases. Information on DNA sequences has been extensively exploited for the development of polymerase chain reaction (PCR)-based assays for various applications, including understanding of parasites and diagnosis of the diseases (10).

With application of PCR and its variations (nested, multiplex, real-time), molecular biology has contributed to the detection of parasite DNA with high sensitivity and specificity (17-19). However, for accurate diagnosis, with a minimum

margin of error, it is necessary the use of internal controls, such as the housekeeping genes. The positivity for these genes demonstrates the quality of the sample under test and guarantees the issuance of a negative result.

Variations of PCR have been developed and used to identify *Leishmania* spp. such as the quantitative polymerase chain reaction (qPCR), nested PCR, and multiplex PCR (20-28). The possibility of combining multiple targets in the same assay led to expansion of applications of the multiplex PCR technique on leishmaniasis diagnosis, since the identification of complexes and species of the parasite to evaluation of sample integrity and PCR performance on sandfly pools (23-28).

Several targets have been used to detect *Leishmania* including kinetoplast DNA (kDNA) with high conserved multiple copies (29-31). Recently the gene for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), single copy, has been used to identify the subgenus *Viannia* being able to distinguish *L. braziliensis* from other species (32).

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PD) is an enzyme with a crucial role in glucose metabolism, with nuclear, cytoplasmic and membrane functions in cells of organisms which use glycolysis to produce energy. The presence of this gene in all mammalian cells ensures its detection in samples whose conditions are suitable for diagnostic tests, making it a potential tool for sample quality control in real-time PCR, as well as the genes of albumin, β -actin and β -globin (20, 33-35). However, in these trials, sample quality assessment is done in separate reactions, generating more costs and increasing the time for determining the diagnosis.

The limitations in diagnosis methods and the lack of access of the population to diagnostic tools indicate the need to develop technologies with quality assurance of results, readily accessible to affected population, and that have a favorable cost-benefit. In this context, this paper aims at developing multiplex PCR systems to limit the possibility of errors in the definition of the final diagnosis, in human or animal patients, to promote the simultaneous detection of specific target (*L. infantum* or *L. braziliensis*) and quality control of the samples (G3PD gene from mammals) in the same reaction, which will reduce costs with reagents and time for

the release of diagnosis. This tool will be useful for the diagnosis of leishmaniasis as well as for epidemiological studies.

MATERIALS AND METHODS

Blood Samples

Blood was collected from *Homo sapiens*, *Canis familiaris*, *Oryctolagus cuniculus*, *Necromys lasiurus* and *Rattus rattus* to assess the reproducibility of the multiplex PCR systems in samples from different mammals. Informed consent was obtained from all studied subjects, from the database of Leishmaniasis Reference Service (LRS), Fiocruz, PE, Brazil. In addition, the present study was approved by the Research Ethics Committee (CEP-FIOCRUZ/PE, 42/2010) and by the Ethics Committee in Animal Use (CEUA-FIOCRUZ/RJ, LW-41/10).

DNA Extraction

The extraction of DNA from blood samples was performed with Illustra® blood genomic Prep Mini Spin kit (GE Healthcare, USA) according to the manufacturer's recommendations.

Primers Design

Based on the results of Castilho *et al.* (33), MEGA software (4.0) (available online at www.megasoftware.net) was employed for alignment of G3PD sequences from different mammals involved in the transmission cycle of leishmaniasis, using a NCBI BLAST database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). From this alignment, two primers were designed capable of binding to DNA to the following mammalian species: *Homo sapiens*, *Sus scrofa*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Sigmodon hispidus*, *Equus caballus*, *Felis catus*, *Bos taurus*, *Macaca fascicularis*, *Macaca auratus*, *Oryctolagus aries*, *Canis lupus* and *Canis familiaris*.

G3PD Detection Systems

To develop G3PD detection systems, the primers presented by Castilho *et al.* (33), GAPD-F and GAPD-R, were combined with primers designed in this study, looking for a better differentiation among bands for detection of *Leishmania* spp. and composition of multiplex PCR systems. For a preliminary assessment of G3PD gene systems, an experiment was conducted in which the reaction was composed of sample without DNA (negative control), dog

blood samples that tested positive and negative for VL, and genomic DNA of *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) as a positive control under the conditions and system described by Lachaud *et al.* (36).

Multiplex PCR System Development

Two multiplex PCR systems were developed and tested under the conditions of the Linf 1B and B1/B2 for simultaneous detection of *L. infantum* or *L. braziliensis* and G3PD gene, respectively (20, 29).

Optimization of Multiplex PCR Systems

Reproducibility evaluation in different mammalian species

Blood samples from *Homo sapiens*, *Canis familiaris*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rattus rattus* and *Necromys lasiurus* were used.

The analysis of positive results was performed by adding genomic DNA of *L. infantum* or *L. braziliensis* in samples of each animal species used in the study, based on the optimal range of detection of Linf 1B and B1/B2 (20, 29). When it was necessary, modifications in cycling conditions (annealing temperatures and extension) were made, as well as alterations in quantity and concentration of reagents.

Detection range determination

A dilution curve of factor 10 (10 ng to 0.1 fg) of parasite DNA, tested in both multiplex PCR reactions, to check possible loss of sensitivity of multiplex PCR reaction compared to conventional systems was performed.

Documentation of Results

The analysis, interpretation and registry of test results were performed using 1.5% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide (10 mg/mL), and a molecular weight marker 100 bp ladder DNA (GibcoBRL Life Technologies, USA).

Testing of Patient Samples

After optimization, the multiplex PCR for visceral leishmaniasis (mVL) and the multiplex PCR for American cutaneous leishmaniasis (mACL) systems were evaluated in 96 blood and bone marrow samples from human and dog patients, and 52 biopsy samples from human

patients. These samples had been previously tested positive for leishmaniasis by conventional PCR, at LRS, Fiocruz/PE, Brazil.

Sensitivity, specificity and efficiency of mVL and mACL were calculated according to Ferreira and Ávila (37).

RESULTS

G3PD Detection Systems

The designed primers (Figure 1) were combined with GAPD-F and GAPD-R and three detection systems were generated: G3PD1, G3PD2 and G3PD3 (Table 1) (33). The result of preliminary experiment showed an excellent performance of the three systems designed for G3PD gene detection (Figure 2).

Based on the products generated for simultaneous detection of *L. infantum*, *L. braziliensis* and G3PD gene, the G3PD2 system was chosen for optimization of the multiplex PCR for *L. infantum* detection, and the multiplex

PCR for *L. braziliensis* detection (Table 2).

mVL Optimization

The analysis of experiments under conditions of Linf 1B showed no reproducible results (20). In order to generate reproducibility, the reactions were modified using the conditions described by Lachaud *et al.* (36) with primers of Linf 1B. After the modification, excellent reproducibility was obtained among different mammalian species (Figure 3).

Detection range

To avoid loss of sensitivity for the detection of a specific target (*L. infantum*), the concentration of primers to detect the G3PD gene was reduced, from 5 pmol/μL to 1 pmol/μL, in order to equilibrate the competition among reagents and encourage the Linf 1B system.

The optimal conditions of functioning of mVL, in a final volume of 25 μL, were: *Taq* polymerase buffer 0.5 μM Tris, 1.25 μM KCl, pH 8.4; 0.3 μM



Figure 1. Multiple sequence alignment (generated by MEGA 4.0) of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PD) mammalian that indicates G3F, G1F, G1R and G2R oligonucleotide positions. *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* and *Trypanosoma cruzi* are not similar to the sequences of designed primers. G3F and G1R*: primers designed in this study and their aligned sequences; G1F[■] and G2R[■]: primers GAPD-F/R previously presented (4) and their aligned sequences. ■ – G3PD 2 system – primers G1F and G2R.

Table 1. Detection systems formed by the combination of primers designed for detection of the G3PD gene

System identification	Primers	Product size
G3PD 1	G1F x G1R	441 bp
G3PD 2	G1F x G2R	567 bp
G3PD 3	G3F x G1R	621 bp

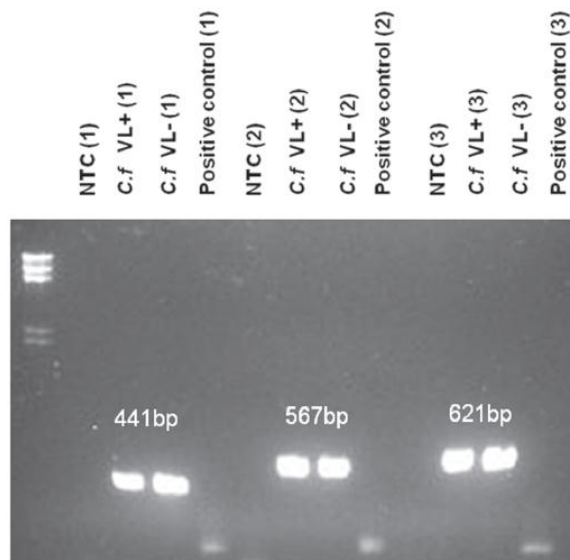


Figure 2. Systems G3PD1 (1), G3PD2 (2) and G3PD3 (3). The templates in each column are identified in the picture: NTC – non template control; *C. familiaris* positive for VL; *C. familiaris* negative for VL; genomic DNA from *L. chagasi* as positive control (132 bp band). Product size was determined by Marker λ DNA / Hind III (New England Biolabs, USA).

MgCl₂; 5 nM dNTP; 5 μ M of each primer Linf 1B; 1 μ M G1F; 1 μ M G2R; 0,25U *Taq* polymerase and 2 μ L DNA template. In these conditions, the mVL showed a detection limit of 0.1 fg.

Table 2. Systems chosen for composition of the reaction of multiplex PCR for simultaneous detection of *L. infantum* and *L. braziliensis* and quality control samples, the gene G3PD of mammals

Systems	mVL	mACL
B1/B2	–	750 bp
G3PD2	567 bp	567 bp
Linf1B	132 bp	–

Testing of Patient Samples

A total of 32 (33%) samples did not pass quality control and were rejected for validation tests. The evaluation of mVL in patient samples showed: 25% sensitivity, 97% specificity and 79% efficiency.

The low sensitivity obtained in contrast with the excellent detection limit created the hypothesis of sample degradation due to long storage time (samples stored since 2005). To check the sensitivity of mVL in blood samples and rule out possible flaws in this diagnostic system developed, a dilution curve similar to that aforementioned was performed, by diluting DNA from *L. infantum* in freshly collected human blood. The analysis of this experiment showed that the mVL system does not have failures in the detection limit (detection of 0.1 fg) and tested positive all blood samples recently collected.

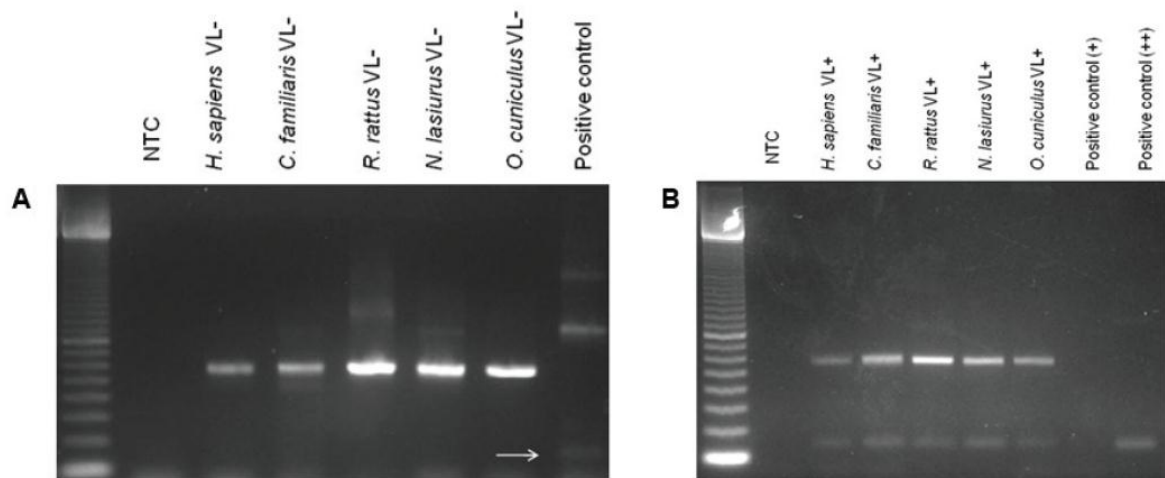


Figure 3. Reproducibility test of mVL system in negative (A) and positive (B) samples of different mammals involved in leishmaniasis cycle. (A) Arrow: 132 bp band of *L. chagasi* positive control. (B) G3PD gene with a band of 567 bp and the specific target *L. chagasi* with a band of 132 bp. Positive control (+) = 100 fg/ μ L; positive control (++) = 10 pg/ μ L. Product size was determined by a 100 bp ladder DNA (GibcoBRL-Life Technologies, USA).

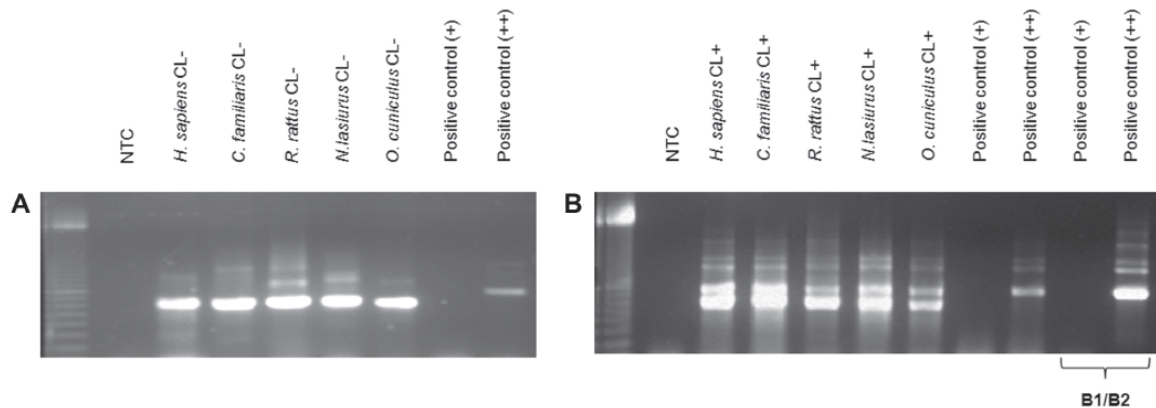


Figure 4. (A) Reproducibility of mACL in negative samples of different mammals. Positive control (+) = *L. braziliensis* 1 pg/ μ L. Positive control (++) = *L. braziliensis* 1 ng/ μ L. (B) Reproducibility of mACL in positive samples. For positive evaluation 100 ng of *L. braziliensis* DNA was added to samples of different mammals. The bands observed are from G3PD gene (band of 567 bp) and the specific target *L. braziliensis* (band of 750 bp). Positive control (+) = *L. braziliensis*, 1 pg/ μ L. Positive control (++) = *L. braziliensis*, 1 ng/ μ L. Product size was determined by a 100 bp ladder DNA (GibcoBRL-Life Technologies, USA).

mACL Optimization

Reproducibility in different mammals

The mACL worked well under the following reaction conditions: *Taq* polymerase buffer 0.5 μ M Tris, 1.25 μ M KCl, pH 8.4; 0.3 μ M MgCl₂; 5 nM dNTP; 25 μ M of B1/B2 primers mixture; 5 μ M G1F; 5 μ M G2R; 0.25 U *Taq* polymerase and 2 μ L DNA template. It showed reproducibility among different mammalian species, and both negative and positive samples (Figure 4).

Detection range

A temperature gradient was applied to verify the conditions under which mACL has a better detection limit. The optimal cycling conditions in a final volume of 25 μ L were: initial denaturation: 94°C for five minutes; denaturation: 94°C for 30 seconds; annealing: 63°C for one minute; extension: 72°C for one minute; final extension: 72°C for five minutes. In these conditions, the mACL showed a detection limit of 10 pg.

Testing of Patients Samples

The evaluation of the mACL system in biopsy samples showed sensitivity and specificity of 100% and 87.5% respectively, and 92% efficiency.

DISCUSSION

The main deficiencies in applying PCR assays include false-positive results (from background

DNA contamination) and potential false-negative results, besides the detection limits of the assay. Clinical samples often contain substances that may partially or completely inhibit the amplification reaction by the DNA polymerase (38, 39). Appropriate care and correct conditioning of the sample may prevent such problems, but the integrity of target DNA must be monitored. Methods that ensure the best sample processing include incorporation of internal amplification controls into the PCR assay to monitor the presence of purified sample DNA and potential PCR inhibitors (40).

The need to include internal controls has been observed in various types of clinical samples, especially in materials in which purification of nucleic acids is difficult due to abundance of organic matter such as feces and food (41-46). The inclusion in PCR assays of genes that constitute cells such as β -actin, β -globin, albumin and G3PD has been useful to evaluate the quality of samples in qPCR and PCR experiments (20, 34, 47, 48). Due to the recognized need for evaluating the integrity of DNA, controls are usually used in separate reactions, generating more costs and consuming more time to establish the diagnosis (49).

In the present study, three detection systems were created to allow distinction among the various targets used in the molecular diagnosis of leishmaniasis. In addition, the developed

control systems have a wide applicability in molecular diagnostics, and can be optimized in a similar way with PCR-based diagnosis of bacteria, virus, and other protozoa, which did not evaluate the possibility of false-negative results in their tests (50-53). The goal of the current study was to evaluate the quality of samples associated with detection of a target in the same reaction, in order to provide a safe outcome for patient diagnosis and also to apply it in epidemiological studies. The evaluation of the reproducibility of mVL and mACL systems showed that they can be used in research of new reservoirs, contributing to the expansion of leishmaniasis eco-epidemiology knowledge and adequacy of control measures for each source of the disease.

The detection limit presented by mVL was higher than that recorded by Paiva-Cavalcanti *et al.* (20), with no reduction of efficiency in multiplex PCR compared to real-time PCR. Disch *et al.* (54) suggested a duplex PCR for *L. donovani* complex with 4.7 fg of detection limit, lower than the limit reached by mVL. Harris *et al.* (26) proposed a multiplex PCR with 1 fg of detection limit for characterization of new world *Leishmania* complexes. The proposal presented in the present study has better detection ability and is species-specific.

The evaluation of patient samples revealed a significant loss of reliability due to poor quality samples or their degradation (33% of the samples tested negative in internal control). Despite of low sensitivity obtained in mVL, the experiment conducted on recently collected blood, maintained an excellent detection limit and showed that losses due to degradation occur in samples stored for long periods (such as samples from LRS, stored since 2005), and the DNA of etiological agent is the most affected, probably because there is less of its DNA material than of the host. Despite the low sensitivity obtained in mVL, the system showed specificity and detection limits in accordance with the objective.

The mACL showed better sensitivity than that reported by Bruijn and Barker (29), for the system B1/B2 alone. Marcussi *et al.* (55) presented the LBF1/LBR1 primers for identification of *L. braziliensis* with a limit of 50 ng of DNA in the reaction, a detection limit lower than mACL.

The tested samples for mACL showed excellent results that suggest its use in routine diagnoses. Gomes *et al.* (56), evaluating PCR for detection

of *L. braziliensis* in biopsy samples, obtained 96% sensitivity. Despite the fact that the SL RNA gene was the target, the results of Gomes *et al.* (56) are similar to mACL.

The detection limits provided by the two multiplex showed that this molecular diagnostic tool can be used without loss of efficiency, besides promoting reduction of reagent costs and time for the institution of therapy. These data are extremely important to regions where the disease is endemic, since the developed techniques may promote improvements in quality of life of affected persons by reducing the risk of serious injuries due to ACL.

During the validation of this method, the importance of having sample quality control was proved by the percentage of degraded samples detected by mVL. Some methodologies employed in recent studies do not perform the evaluation of sample quality, and in this case, there is no guarantee of the accuracy of negative results. The use of sample control in the same reaction without sacrificing sensitivity (mACL) or detection limits (mVL) of the original system is an advantage for the economy of reagents and time compared to reactions conducted separately.

Given to the limitations presented by conventional methods, the development of a tool that is able to promote an accurate diagnosis is essential. In this context, this study presents two multiplex PCR that allows assessment of the quality of the sample simultaneously with the detection of *L. infantum* or *L. braziliensis*, therefore reducing the number of false negatives and assuring the quality of results. The methods can be applied both for diagnosis in humans and animals, and their use is particularly indicated in routine diagnosis and research.

CONCLUSION

The development of mVL and mACL systems may be implemented in the diagnosis in LRS, Brazil. Additionally, the systems designed to detect the G3PD gene are able to combine with other agents for molecular diagnosis. For leishmaniasis, the multiplex systems might be used in epidemiological studies for detection of new and classic reservoirs, contributing to the reliability of results and development of actions to control the disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Luciana A. Figueredo for her substantial comments on this paper.

COPYRIGHT

© CEVAP 2012

SUBMISSION STATUS

Received: November 17, 2011.

Accepted: February 24, 2012.

Abstract published online: March 6, 2012.

Full paper published online: May 31, 2012.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

FINANCIAL SOURCE

The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), The State of Pernambuco Research Foundation (FACEPE) and CPqAM-FIOCRUZ/PE provided the financial grants

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The present study was approved by the Research Ethics Committee of Oswaldo Cruz Foundation, Recife, PE, Brazil (CEP-FIOCRUZ/PE, 42/2010) and by the Ethics Committee in Animal Use of Oswaldo Cruz Foundation, Recife, PE, Brazil (CEUA-FIOCRUZ/RJ, LW-41/10).

CORRESPONDENCE TO

Milena de Paiva-Cavalcanti, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420, Brasil. Phone: +55 81 21012679. Fax: +55 81 21012640. Email: mp@cpqam.fiocruz.br.

REFERENCES

- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999;354(9185):1191-9.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366(9496):1561-77.
- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004;95(3):239-43.
- WHO. World Health Organization. Health topics: leishmaniasis [Internet]. Geneva: Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases (TDR). [cited 2010 Jan 26]. Available from: <http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/leishmaniasis>.
- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press; 1987. p. 1-120.
- Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vectors*. 2009;2(Suppl 1):S1.
- Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res*. 2006;123(1):311-30.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(11):873-82.
- Singh S, Dey A, Sivakumar R. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005;5(1):251-65.
- Schallig HD, Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Int Health*. 2002;7(8): 641-51.
- Camargo JB, Langoni H, Troncarelli MZ, Machado JG, Lucheis SB, Padovani CR. Performance of IFAT, ELISA, direct parasitological examination and PCR on lymph node aspirates for canine visceral leishmaniasis diagnosis. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2010;16(3):414-20.
- 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(1):746-9.
- Wilson SM. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: fields applications and practicalities. *Ann Trop Med Parasitol*. 1995;89(Suppl 1):95-100.
- Ozensoy S, Ozbel Y, Turgay N, Alkan MZ, Gul K, Gilman-Sachs A, et al. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(3):363-9.
- 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.
- Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the propose assay on clinical samples. *Vet Parasitol*. 2003;113(2):99-113.
- Paiva-Cavalcanti M, Régis-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 Dis*. 2010;16(4):537-42.
- Santamaría E, Ponce N, Puerta C, Ferro C. Validación de la PCR en la detección de parásitos de *Leishmania (Viahna) spp.* en *Lutzomyia (Diptera:Psychodidae)* como herramienta en la definición de especies vectores. *Biomedica*. 2005;25(1):271-9.

19. Schwartz E, Hatz C, Blum J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(6):342-9.
20. Paiva-Cavalcanti M, Felinto de Brito ME, de Souza WV, de Miranda Gomes Y, Abath FC. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. *Vet J.* 2009;182(2):356-8.
21. Fisa R, Riera C, Gállego M, Manubens J, Portús M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol.* 2001;99(2):105-11.
22. Akhavan AA, Mirhendi H, Khamesipour A, Alimohammadia MH, Rassi Y, Bates P, et al. Leishmania species: detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. *Exp Parasitol.* 2010;126(4):552-6.
23. de Pita-Pereira D, Cardoso MA, Alves CR, Brazil RP, Britto C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Trop.* 2008;107(1):66-9.
24. Rodríguez-González I, Marín C, Logoni SS, Mateo H, Alunda JM, Minaya G, et al. Identification of New World *Leishmania* species from Peru by biochemical techniques and multiplex PCR assay. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;267(1):9-16.
25. Jorquera A, González R, Marchán-Marcano E, Oviedo M, Matos M. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(1):45-8.
26. 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.
27. de Pita-Pereira D, Souza GD, Pereira T de A, Zwetsch A, Britto C, Rangel EF. *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American cutaneous leishmaniasis: detection of natural infection by *Leishmania (Viannia)* DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. *Acta Trop.* 2011;120(3):273-5.
28. Oliveira DM, Reinhold-Castro KR, Bernal MV, Legriffon CM, Lonardon MV, Teodoro U, et al. Natural infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania (Viannia)* spp. in the state of Paraná, southern Brazil, detected by multiplex polymerase chain reaction. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;11(2):137-43.
29. Bruijn MH, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.* 1992;52(1):45-58.
30. Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C et al. Diagnosis of leishmania using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;49(3):348-56.
31. Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *J Eukaryot Microbiol.* 1994;41(4):324-30.
32. Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J Clin Microbiol.* 2003;41(2):540-6.
33. Castilho TM, Camargo LMA, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(1):122-32.
34. Gilsbach R, Kouta M, Bönisch H, Brüss M. Comparison of *in vitro* and *in vivo* reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *Biotechniques.* 2006;40(2):173-7.
35. Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2007;147(3-4):315-9.
36. 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. *Parasitology.* 2002;125(Pt 3):197-207.
37. Ferreira AW, Ávila SLM. Sorologia: importância e parâmetros. In: Ávila SLM, Ferreira AW, editors. *Diagnósticos de laboratório das principais doenças infecciosas e auto-imunes.* 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Press; 2001. 3-8 p.
38. Jackson DP, Haden JD, Quirke P. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. In: McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR, editors. *PCR: a practical approach.* New York: Oxford University Press; 1991. 29-50 p.
39. Degraeve W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994;89(3):463-9.
40. Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(6):337-48.
41. Thoreson AC, Borre M, Andersen LP, Jorgensen F, Kiilerich S, Scheibel J, et al. *Helicobacter pylori* detection in human biopsies: a competitive PCR assay with internal control reveals false results. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999;24(2):201-8.
42. LeBlanc-Maridor M, Garénaux A, Beaudeau F, Chidaine B, Seegers H, Denis M, et al. Quantification of *Campylobacter* spp. in pig feces by direct real-time PCR with an internal control of extraction and amplification. *J Microbiol Methods.* 2011;85(1):53-61.
43. Bezold G, Volkenandt M, Gottlöber P, Peter RU. Detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus in clinical swabs: frequent inhibition

- of PCR as determined by internal controls. *Mol Diagn.* 2000;5(4):279-84.
44. Lund M, Madsen M. Strategies for the inclusion of an internal amplification control in conventional and real time PCR detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples. *Mol Cell Probes.* 2006;20(2):92-9.
 45. Murphy NM, McLauchlin J, Ohai C, Grant KA. Construction and evaluation of a microbiological positive process internal control for PCR-based examination of food samples for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Int J Food Microbiol.* 2007;120(1-2):110-9.
 46. Cubero J, van der Wolf J, van Beekhoven J, López MM. An internal control for the diagnosis of crown gall by PCR. *J Microbiol Methods.* 2002;51(3):387-92.
 47. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol.* 2004;42(11):5249-55.
 48. Kompalic-Cristo A, Frotta C, Suárez-Mutis M, Fernandes O, Britto C. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitol Res.* 2007;101(3):619-25.
 49. Müller N, Zimmermann V, Forster U, Bienz M, Gottstein B, Welle M. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. *Vet Parasitol.* 2003;114(3):223-9.
 50. Palaniappan RU, Chang YF, Chang CF, Pan MJ, Yang CW, Harpending P, et al. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Mol Cell Probes.* 2005;19(2):111-7.
 51. Ferrari HF, Luvizotto MC, Rahal P, Cardoso TC. Detection of bovine *Herpesvirus* type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by PCR: a useful adjunct to conventional tissue-based diagnostic test of bovine encephalitis. *J Virol Methods.* 2007;146(1-2):335-40.
 52. Miyamoto CT, Gomes ML, Marangon AV, de Araújo SM, Bahia MT, Martins-Filho OA, et al. Usefulness of the polymerase chain reaction for monitoring cure of mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes following treatment with benznidazole. *Exp Parasitol.* 2008;120(1):45-9.
 53. Montoya A, Miró G, Mateo M, Ramírez C, Fuentes I. Detection of *Toxoplasma gondii* in cats by comparing bioassay in mice and polymerase chain reaction (PCR). *Vet Parasitol.* 2009;160(1-2):159-62.
 54. Disch J, Caligiorne RB, Maciel F, Oliveira MC, Orsini M, Dias-Neto E, et al. Single-step duplex kDNA-PCR for detection of *Leishmania donovani* complex in human peripheral blood samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;56(4):395-400.
 55. Marcussi VM, Marcussi LM, Barbosa-Tessmann IP, Lonardoni MV, Silveira TG. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: new primers for identification using polymerase chain reaction. *Exp Parasitol.* 2008;120(4):300-5.
 56. Gomes AH, Armelin IM, Menon SZ, Pereira-Chiocola VL. *Leishmania (V.) braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 2008;119(3):319-24.

APÊNDICE C - Artigo relacionado aceito para publicação

Periódico : *The Journal of Venomous animals and Toxins Including Tropical Diseases*

Tracking false-negative results on molecular diagnosis: Proposal of a triplex-PCR based method for leishmaniasis diagnosis

Suênia C. Gonçalves-de-Albuquerque ^a, Rômulo P. Silva ^a, Rayana C. S. Morais ^a,
Carlos G. Régis-da-Silva ^a, Filipe Dantas-Torres ^{a,b}, Sinval P. Brandão-Filho ^a, Milena de
Paiva-Cavalcanti ^{a,*}

^a *Department of Immunology, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Prof. Moraes Rego s / n, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil*

^b *Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Bari, Strada Provinciale per Casamassima km 3, 70010 Valenzano, Bari, Italy*

* **Corresponding author.** Tel.: +55 81 21012679; fax: +55 81 21012640.

E-mail address: mp@cpqam.fiocruz.br (M. Paiva-Cavalcanti).

E-mail addresses:

SCG: sueniaaaa@hotmail.com

RPS: romulops3@hotmail.com

RCSM: rayanacarla_m@hotmail.com

CGRS: carlosg@cpqam.fiocruz.br

FDT: filipe.vet@globo.com

SPBF: sinval@cpqam.fiocruz.br

ABSTRACT

Background: Molecular biology methods have become increasingly relevant to the diagnosis and control of infectious diseases, such as leishmaniasis. Since various factors may affect the sensitivity of PCR assays, including DNA yield and purity, an optimal extraction method is pivotal. Losses of parasite's DNA during extraction may significantly impair its detection by PCR and lead to false-negative results. This study proposes a triplex PCR assay targeting the parasite's DNA, an external control (pUC18) and an internal control (G3PD) for accurate diagnosis of leishmaniasis. **Results:** Three primers pairs were adapted to detect *Leishmania braziliensis* DNA, the external and the internal control. The triplex PCR assay was assessed regarding its ability in detecting the three target DNA fragments simultaneously. PCR products from pUC18 DNA resulted in bands of 368 (P1) and 316 (P2) base pairs (bp). The triplex PCR assay allowed the simultaneous detection of the internal and external controls as well as of small quantities (10 pg of parasite's DNA) of the target parasite's DNA.

Conclusions: The new tool standardized herein brings more reliable interpretation of the PCR results, mainly contributing for quality assurance of leishmaniasis diagnosis. Furthermore, after simple standardization steps, this protocol could be applied to the diagnosis of other infectious diseases in reference laboratories. This triplex PCR enables the assessment of small losses during the DNA extraction process, problems concerning DNA degradation (sample quality) and the detection of *L. (V.) braziliensis* kDNA.

Keywords: Extraction control, multiplex PCR, pUC18, leishmaniasis, diagnosis, false-negative

Background

Molecular biology methods have become increasingly relevant to the diagnosis and control of infectious diseases, such as leishmaniasis. Information on DNA sequences has been extensively exploited for the development of polymerase chain reaction (PCR)-based assays for various applications, including understanding of parasite genetics and diagnosis of parasitic diseases [1]. DNA analysis offers advantages over traditional serological and parasitological methods, including decreased processing time of samples and elimination of the need for cultivation [2, 3]. As a result, medical and veterinary diagnostic and public health laboratories worldwide are increasingly being called upon to introduce molecular diagnostic tests for both endemic and exotic diseases [4]

PCR and its variations (e.g., nested, multiplex, real-time) have contributed to detection of disease agents in humans and animals, including *Leishmania* spp. with high sensitivity and specificity [5 – 7]. Additionally, the possibility of combining multiple targets in the same assay enables the identification of parasites to the species level [8 – 10], the evaluation of sample integrity and also PCR performance on pools of phlebotomine sand flies [11, 12].

Recently, a duplex PCR assay was standardized to evaluate the integrity of the DNA template by amplifying the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (G3PD or GAPDH) of mammals in the same reaction for the diagnosis of *Leishmania* spp. Infection [7]. The quality of the DNA samples extracted from blood and biopsies was evaluated by including a primer system to detect the G3PD gene in two standardized PCR assays for *L. infantum* (mVL) or *L. (V.) braziliensis* (mACL). The expression of this gene in all mammalian cells ensures its detection in samples whose conditions are suitable for diagnostic tests [13 – 15]. In the aforementioned study, the endogenous control was negative in 33% of the samples tested, demonstrating losses in terms of reliability due to poor quality samples. In addition, some known positive samples, with quality assured by the G3PD detection, were

PCR-negative for the main DNA target (*L. infantum*). These results indicated the necessity of high quality assurance of each individual sample, also to assess possible losses of minimal amounts of the target parasite's DNA.

The extraction of nucleic acids from biological samples is a critical step and may result in losses of the target DNA [16]. Since various factors may affect the sensitivity of PCR assays, including DNA yield and purity, an optimal extraction method is pivotal. In recent years, commercial extraction kits have become available for blood and other biological specimens, such as skin. These kits perform direct cell lysis, speeding up sample processing and reducing the potential of variability, which has led to common use. However, extraction protocols often suffer from inadequacies including incomplete cell lysis, DNA binding to surfaces, poor DNA recovery and the co-extraction of salts and proteins that inhibit DNA-DNA hybridization and enzymatic reactions [16,17].

Realizing the importance of DNA extraction for the proper functioning of PCR-based methods, several groups have evaluated the efficiency of commercial kits for different types of samples [16, 18 – 20]. Nevertheless, the most routine PCR protocols monitor the sample quality by spectrophotometric determination of DNA or in separate reactions, neither controlling for PCR inhibition nor confirming successful DNA extraction recovery, ultimately increasing the costs and chances of false-negative results. Conversely, the detection of a known-to-be-present DNA sequence in the sample may reveal possible losses of genetic material during the purification process, bringing more correct interpretation of the PCR results. Therefore, to refine the molecular diagnosis of human and canine leishmaniasis, this study assessed a molecular triplex PCR assay targeting an external control (a commercial plasmid), an internal control (a housekeeping gene) and the target parasite's DNA (*L. (V.) braziliensis* kinetoplast DNA). This method may be adapted for the molecular diagnosis of any infectious disease, providing fast results with small margin of error.

Materials and methods

Blood samples and controls

Human and canine blood samples were collected from healthy individuals and dogs and used as controls. Informed consent forms were obtained from all dog owners and individuals included in the study and all procedures were approved by the Research Ethics Committee (CEP-FIOCRUZ/PE, 42/2010) and by the Ethics Committee in Animal Use (CEUA-FIOCRUZ/RJ, LW-41/10) of our institution. As positive controls, blood samples from healthy dogs and humans were spiked with genomic DNA of *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903): $\sim 4.5 \times 10^3$ parasites/ml were used, considering the detection limit (mACL = 10 pg) of the duplex PCR as determined previously [7].

DNA extraction by commercial kit

Blood DNA extraction was performed using a commercial kit (Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare, USA), following the manufacturer's instructions and comprising basically five steps: blood cell lysis, load and bind, wash 1, wash 2, and elution. After protein degradation and cell lysis, before the second step (load and bind), the plasmid pUC18 was added according to the predetermined limit of detection.

Plasmid pUC 18, primers design and multiplex PCR standardization

The commercial plasmid pUC18 (Boehringer Mannheim, Brazil) was used to assess DNA losses during the extraction process. Two primer pairs were designed based on two sequences available in GenBank [GenBank: L08752] and [Genbank:L09136]. PCR trials were conducted to evaluate the performance of the two pUC18 detection systems. Non-template control (NTC) and three different concentrations of pUC18 were included in each PCR run. Based on these preliminary results, the primer pair with the best performance was chosen to compose

the triplex system. The detection limit of the PCR was assessed by testing 10-fold serial dilutions (from 50 ng/μl to 0.5 fg/μl) of pUC18. Concentrations between 1 and 20 μM of the forward (*Pf*) and reverse (*Pr*) primers were tested to determine the optimal amount of primers to be included in the duplex PCR reactions for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis (mACL) [7].

For the first triplex PCR trials, according to the preliminary results, the plasmid pUC18 was added to negative and positive controls and each primer (*Pf* and *Pr*) was added to the mACL master mix [7]. The primers *kDNA_f* (5'-ATGCCTCTGGGTAGGGGCGTTC-3') and *kDNA_r* (5'-GGGAGCGCGGCCCACTATATT-3'), designated as *kDNA1* system, were designed herein to detect the conserved region of the *L. (V.) braziliensis* *kDNA*. The standardization process was performed by analyzing the results of the interactions among the systems *Pf/Pr*, G3PD (endogenous control), and *kDNA1*. When necessary, changes were made in the cycling conditions by testing different annealing and extension temperatures performed in the Eppendorf Mastercycler gradient (Eppendorf AG, Germany). To assess the best conditions for the triplex PCR, different amounts of each reagent (dNTP, MgCl₂ and recombinant *Taq* DNA Polymerase - Invitrogen, Brazil) were also evaluated.

Specificity of primer pairs on triplex assays

To evaluate the specificity of the primers in a triplex PCR format, a sample containing the three targets (*L. (V.) braziliensis*, G3PD gene, and pUC18) was subjected to PCR amplification by the three primer sets (*kDNA1*, G3PD and P1) separately, under standardized conditions. The PCR products obtained by this experiment were purified and sequenced using an automatic sequencer (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA). The obtained sequences were analyzed using BioEdit software (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) and compared with similar nucleotide

sequences available in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Gel electrophoresis and documentation

Amplicons were resolved in 1.5% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide (10 mg/ml). A 100 bp Ladder DNA (GibcoBRL Life Technologies, USA) was used as molecular marker. Gel pictures were taken using Kodak MI GL100 Imaging System.

Results

The sequences of the two primer pairs targeting the plasmid pUC18 were: P1_f (5'-CGTAATAGCGAAGAGGCC-3') and P1_r (5'-TAAGAAACCATTATTATC-3') for the system P1; and P2_f (5'-TTGTAAGTACTGAGAGTGCAC-3') and P2_r (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') for the system P2. Amplicons from pUC18 DNA resulted in bands of 368 (P1) and 316 (P2) base pairs (bp), being suitable for multiplex PCR with G3PD (567 bp) and kDNA1 (138 bp). Based on its excellent performance, (Figure 1A) the system P1 was chosen to compose the triplex PCR. The system P2 was not reproducible. The uniplex PCR carried out with pure pUC18 DNA was able to detect as low as 5 pg/μl (total of 10 pg per reaction mixture) as shown in Figure 1B. The lowest amount of primers that held this sensitivity (10 μM of each of them) was chosen to compose the first triplex PCR trials.

Competition among primer pairs and target templates was observed and therefore it was necessary to modify some conditions of mACL and P1 standardized initially. Simultaneous amplification of the three targets (pUC18, G3PD, and *L. (V.) braziliensis*) was obtained under the following conditions: *Taq* Polymerase Buffer (0.7 μM Tris-HCl, 1.8 nM KCl, pH 8.4), 5.6 nM MgCl₂, 40 nM dNTPs, 2 μM of each primer kDNA_f/ kDNA_r1, 5 μM of each primer G1F

/ G2R, 20 µM of each primer Pf/ Pr, 10 U Taq polymerase, and 2 µl DNA template. PCR products are shown in Figure 2.

Sequences of amplicons generated with the system P1 showed high homology (100% identity) with pUC18 cloning vector [GenBank: L08752.1]. High homologies (100% identity) were also found with other cloning vectors [GenBank: JX069764.1, JQ927446.1, HQ207194.1, and FJ389180.1] and with *Bacillus subtilis* [GenBank: CP002468.1]. As far as G3PD, the highest homology (75%) was found with a sequence of a human x-linked GAPD pseudogene [GenBank: X01111.1]. The kDNA1 product was 94% similar to a sequence of *L. (V.) braziliensis* strain MHOM/BR/75/M2904 [GenBank: FR799010.1]. Identities between 88% and 93% were also found with other species of the subgenus *Viannia* (*L. peruviana*, *L. guyanensis*, and *L. panamensis*) (data not shown).

Discussion

The purpose of this work was to bring up the idea of a method to track possible causes of false-negative results on microbiological diagnosis by PCR, requiring minimal technical training. The triplex PCR assay here proposed provides a rapid molecular tool to assess the occurrence of false-negative results by detecting simultaneously two quality controls and the target parasite's DNA simultaneously.

In theory, the differences in terms of guanine and cytosine (GC) contents of primers used (e.g., P1 and kDNA1) could interfere in the annealing temperatures for each primer pair and eventually affect the triplex PCR performance. However, no interference was observed under the standardized conditions.

A lack of reproducibility of the third primer system detecting the extraction control was observed only in positive samples. Depending on the parasitic load in the positive specimens, the early amplification of the parasite's DNA consumes the reagents, leading to no

amplification of the reporter. Indeed, the P1 system gave reproducible results during optimization process in *L. (V.) braziliensis*-negative samples, being helpful in diagnosis interpretation, achieving the proposed aim. Even minimal losses of genetic material may affect significantly the detection of the parasite's DNA, which is often in small quantities, leading to incorrect diagnostic conclusions. Against this background, this new tool brings more reliable interpretation of the PCR results, mainly contributing for quality assurance of leishmaniasis diagnosis. Furthermore, after simple standardization steps, this protocol could be applied to the diagnosis of other infectious diseases in reference laboratories.

While competition between targets was recorded initially, changes in the PCR conditions allowed us to eliminate competition problems, even maintaining the limit of detection (18 parasites per reaction), previously obtained with the mACL duplex system [7]. The simultaneous amplification of three different targets may interfere in limit of detection of the PCR as compared with simplex PCR protocols, which may be able to detect minimal amounts of the parasite DNA [21]. The main advantage of the triplex assay presented herein is the amplification of three different targets, ensuring the quality of the result. The analysis of DNA sequences showed no cross amplification between the three primer pairs included in the triplex PCR assay. Primers designed to detect the plasmid pUC18 and the housekeeping gene G3PD did not amplify *Leishmania* spp. DNA, reducing the possibilities of false-positive results to zero. Interestingly, BLASTn searches revealed that the pUC18 sequence was similar to sequences of other plasmids, which could also be tested and optimized, according to the availability in each laboratory or research group.

The continuous refinement of PCR technologies (e.g., introduction of robotics) and the increasing demand for rapid and efficient diagnostic tools is leading to the overall reduction of costs, making PCR-based methods more accessible [22, 23]. As it occurs with other diagnostic methods (e.g., serology), PCR-based methods are also liable to false-positive (e.g.,

due to background DNA contamination) and false-negative results. False-negative results may be due to many reasons, including low amount of template DNA in the test sample, inadequate removal of PCR inhibitors, ineffective release of microbial DNA content from the host cells, and poor DNA recovery after extraction and purification steps. As a possible solution to clarify the presence of inhibitors or degraded target DNA on samples, constitutive genes have been used in parallel assays to assess the integrity of the DNA template [7, 15]. To improve the cost/benefit relationship and time consuming of this evaluation, we recently proposed a duplex PCR assay capable to detect a housekeeping gene as an endogenous control [7]. Nevertheless, samples from patients with low parasite burden may contain minimal amounts of parasite's DNA, which may be even more affected by degradation or losses during the pre-PCR stages. This fact suggests the need to include additional internal controls to monitor possible failures during critical steps, such as DNA purification. The addition of a reporter DNA template may indicate the presence of *Taq* DNA polymerase inhibitors and degraded microbial DNA, as well as losses of small DNA amounts during the extraction and purification processes.

The advantages of using internal or external controls have been shown with various types of clinical samples [25 – 28]. For instance, an external DNA recovery standard has been developed for the determination of DNA recovery efficiency in soil samples tested by quantitative PCR [16].

In addition, preliminary data indicates that our kDNA1 set of primers can also detect different species of the subgenus *Viannia* (unpublished data), which suggests that this Triplex assay could be standardized to be used in geographic areas where multiple etiological agents of ACL occur in sympatry.

In conclusion, the triplex PCR proposed herein enables the assessment of small losses during the DNA extraction process, problems concerning DNA degradation (sample quality)

and the detection of *L. (V.) braziliensis* kDNA. To our knowledge, no similar method has been applied to the molecular diagnosis of parasitic diseases using blood samples. This method may be applied for the molecular diagnosis of any infectious disease, providing quicker results with minimal margin of error.

Competing Interests

The authors certify that there is no competing interests with any financial organization regarding the material discussed in the manuscript.

Author's contributions

MPC obtained the project. MPC, SCGA and RPS designed the study. CGRS designed primers and gave intellectual support for this work. RPS, RCSM and SCGA performed experiments and their analysis. SCGA carried out the molecular genetic studies, analyzed amplicon's sequencing and drafted the manuscript. FDT, SPBF and all authors read and approved the final version of this manuscript.

Acknowledgements

Thanks to the Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS/Fiocruz) for allowing us to use its facilities, and to Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

References

- [1] Schalling HDFH, Oskam L: **Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification.** *Trop Med Int Health* 2002;**7**:641–651.
- [2] Ogram AV, Sayler GS: **The use of gene probes in the rapid analysis of natural microbial communities.** *J Ind Microbiol* 1988;**3**:281–292.
- [3] Tsai YL, Olson BH: **Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediment.** *Appl Environ Microbiol* 1991;**57**:1070–1074.
- [4] Frank E: **Funding the public health response to terrorism.** *BMJ* 2005;**331**:378–379.
- [5] Akhavan AA, Mirhendi H, Khamesipour A, Alimohammadia MH, Rassi Y, Bates P, et al.: ***Leishmania* species: Detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs.** *Exp Parasitol* 2010;**126**:552–556.
- [6] Paiva-Cavalcanti M, Régis-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 Dis* 2010;**16**:537–542.
- [7] Gonçalves SC, Régis-da-Silva CG, Brito MEF, Brandão-Filho SP, Paiva-Cavalcanti M: **Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of leishmaniasis.** *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2012;**8**:188–197.
- [8] 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**:1989–1995.
- [9] Jorquera A, González R, Marchán-Marcano E, Oviedo M, Matos M: **Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic**

- region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;**100**:45–48.
- [10] Rodríguez-González I, Marín C, Logoni SS, Mateo H, Alunda JM, Minaya G, et al.,: **Identification of New World *Leishmania* species from Peru by biochemical techniques and multiplex PCR assay.** *FEMS Microbiol Lett* 2007;**267**:9–16.
- [11] Pita-Pereira D, Cardoso MAB, Alves CR, Brazil RP, Britto C: **Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay.** *Acta Trop* 2008;**107**:66–69.
- [12] Oliveira DM, Reinhold-Castro KR, Bernal MV, Legriffon CM, Lonardoni MV, Teodoro U, et al.,: **Natural infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania* (*Viannia*) spp. in the state of Paraná, southern Brazil, detected by multiplex polymerase chain reaction.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011;**11**:137–43.
- [13] Gilsbach R, Kouta M, Bönisch H, Brüss M: **Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data.** *Biotechniques* 2006;**40**:173–177.
- [14] Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, et al.,: **Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis.** *Vet Parasitol* 2007;**147**:315–319.
- [15] Castilho TM, Camargo LMA, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM: **A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase.** *Am J Trop Med Hyg* 2008;**78**:122–32.

- [16] Mumy KL, Findlay RH: **Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative-competitive PCR.** *J Microbiol Methods* 2004;**57**:259–268.
- [17] Alm EW, Zheng D, Raskin L: **The presence of humic substances and DNA in RNA extracts affects hybridization results.** *Appl Environ Microbiol* 2000;**66**:4547–4554.
- [18] Coyne SR, Craw PD, Norwood DA, Ulrich MP: **Comparative analysis of the Schleicher and Schuell IsoCode Stix DNA isolation device and the Qiagen QIAamp DNA Mini Kit.** *J Clin Microbiol* 2004;**42**:4859–4862.
- [19] Whitehouse CA, Hottel HE: **Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Francisella tularensis* DNA from spiked soil samples.** *Mol Cell Probes* 2007;**21**:92–96.
- [20] Dauphin LA, Walker RE, Petersen JM, Bowen MD: **Comparative evaluation of automated and manual commercial DNA extraction methods for detection of *Francisella tularensis* DNA from suspensions and spiked swabs by real-time polymerase chain reaction.** *Diagn Microbiol Inf Dis* 2011;**70**:299–306.
- [21] Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL: **PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples.** *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;**47**(1):349 - 358.
- [22] Livengood III CH, Wrenn JW: **Evaluation of COBAS AMPLICOR (Roche): accuracy in detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by coamplification of endocervical specimens.** *J Clin Microbiol* 2001;**39**:2928–2932.
- [23] Yang S, Rothman RE: **PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings.** *Lancet Infect Dis* 2004;**4**:337–348.

- [24] Reiss RA, Rutz B: **Quality control PCR: a method for detecting inhibitors of Taq DNA polymerase.** *Biotechniques* 1999;**27**:920–926.
- [25] Cubero J, van der Wolf J, van Beckhoven J, López MM: **An internal control for the diagnosis of crown gall by PCR.** *J Microbiol Methods* 2002;**51**:387–392.
- [26] Lund M, Madsen M: **Strategies for the inclusion of an internal amplification control in conventional and real time PCR detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples.** *Mol Cell Probes* 2006;**20**:92–99.
- [27] Murphy NM, McLauchlin J, Ohai C, Grant KA: **Construction and evaluation of a microbiological positive process internal control for PCR-based examination of food samples for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*.** *Int J Food Microbiol* 2007;**120**:110–119.
- [28] LeBlanc-Maridor M, Garénaux A, Beaudeau F, Chidaine B, Seegers H, Denis M, et al.: **Quantification of *Campylobacter* spp. in pig feces by direct real-time PCR with an internal control of extraction and amplification.** *J Microbiol Methods* 2011;**85**:53–61

APÊNDICE D - Artigo relacionado submetido à publicação

Periódico: *Research in Veterinary Science*

Quality assurance in molecular diagnosis of parasitic and infectious diseases: the example of cutaneous and visceral leishmaniasis

Triplex PCR Assays for Leishmaniasis Diagnosis

**Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque¹, Rômulo Pessoa e Silva¹, Lays
Adrienne Mendonça Trajano Silva¹, Rayana Carla Silva de Moraes¹, Sinval Pinto
Brandão Filho¹, Milena de Paiva Cavalcanti¹**

¹ Department of Immunology, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Prof. Moraes Rego s / n, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil

Abstract

Background: Early detection of leishmaniasis and prompt institution of treatment are paramount for individuals and communities affected by these diseases. In this context, early diagnosis is critical and PCR has proven to be an efficient tool. However, limitations inherent to the molecular tools in current use remain. To overcome these limitations and to ensure the accuracy of results, two triplex PCR assays with quality controls for the reactions detecting leishmaniasis were developed.

Methodology/Principal findings: Two primer sets to detect internal and external controls were adapted to protocols for the detection of *Leishmania infantum* and *L. (V.) braziliensis* and two triplex reactions were optimized. The sensitivity (S), specificity (E) and efficiency (e) were assessed in 189 dog blood samples from areas where cutaneous and visceral leishmaniasis are endemic in Brazil. The kappa coefficient (k) was calculated to compare the level of agreement between the new tools and validated PCR and real time PCR protocols which were used as the gold standards. The triplex PCR for visceral leishmaniasis showed S = 78.68%, E = 85.29% and e = 81.05%, with a good agreement (k = 0.60, p<0.0001) with the gold standards. The cutaneous leishmaniasis protocol showed S = 97.29%, E = 79.16% and e = 90.16%. Additionally, kappa analysis (k = 0.78, p<0.0001) showed excellent agreement of this protocol with the gold standards.

Conclusions/Significance: These new tools enable, in a single reaction, the diagnosis of the diseases and the evaluation of the sample quality and DNA extraction process, thus reducing the cost of reagents and avoiding the eventual need for collecting of a second sample. They may also be applied to assess diagnostic errors, contributing to a faster implementation of treatment, and adapted for the molecular diagnosis of any parasitic and infectious disease, providing quicker results with minimal margin of error.

Author Summary

Leishmaniasis are neglected tropical diseases which the number of new cases worldwide can reach 1.7 million people. The earlier diagnosis and, consequently, the prompt treatment are important control measures, since sick animals and humans contribute to maintain the disease cycle. Molecular methods have been successfully applied for the diagnosis of leishmaniasis, allowing brief and accurate results. Nevertheless, these still have some limitations; degradation of genomic material can occur during long time storage, inhibitors present in the samples may occasionally impair the detection of the aetiological agent and DNA losses during the DNA extraction process favour false negative results. The aims of this study were to optimize two diagnostic systems for detecting *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* infection, with the addition of quality controls to assure reliability of the results simultaneously in the same reaction. These two systems were successfully developed (VL triplex and CL triplex) offering a fast and accurate diagnosis, thereby contributing to the rapid diagnosis and prompt treatment of these diseases.

Introduction

Neglected tropical diseases (NTD) affect about one billion people worldwide and are among the major causes of illness in developing countries, where they produce significant disability in the poorest populations [1,2,3]. Among NTD, leishmaniasis represents a major threat for public health in 98 countries, with about 350 million people at risk of these infections [4]. Although around 400 thousand cases of visceral leishmaniasis (VL) and 1.2 million cases of cutaneous leishmaniasis (CL) are reported per year in endemic areas [1], these diseases remain grossly ignored in the list of tropical disease priorities [5,6], in most of the countries where they are endemic. Control strategies rely on reservoir and vector control, the use of insecticide-impregnated materials, active case detection, and treatment [5,6]. In this context, early diagnosis and a prompt institution of therapy is of paramount importance for reducing the risk of transmission at both the individual and community levels, in endemic areas [5].

Confirmation of leishmaniasis diagnosis is generally achieved by the detection of amastigote forms in stained microscopic preparations or by culturing the parasites from infected tissues (e.g., skin biopsies, bone marrow or spleen aspirates) [7]. In endemic areas, immunologic tests are used not only for diagnostic purposes but also as a tool in epidemiological studies. The most employed techniques are the Montenegro skin test (MST), indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) and enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA). In fact, the association of immunologic tests with direct parasitological examination is frequently used in the diagnostic routine in endemic areas [4,8,9].

Nonetheless, parasitologic and serologic methods for leishmaniasis diagnosis have some limitations. They have low sensitivity and specificity in discriminating among *Leishmania* species and they may not allow the differentiation between active or past infections [10]. The limitations inherent to the microscopy and immunology-based assays have spurred parasitologists towards the use of more refined molecular tools [11]. Besides the conventional PCR, other PCR-based methods, including nested-PCR [12,13], multiplex PCR [14], and real-time PCR (or quantitative PCR - qPCR), have been recently implemented for the detection of several parasitic

infections [15,16,17]. The use of molecular diagnostic techniques has shown that PCR can achieve “gold standard” criteria, in some instances [18].

Nonetheless, the PCR limitations related to the evaluation of the quality of samples and DNA extraction procedures may cause false-negative results, when compared with conventional parasitological methods [19]. Indeed, the results of studies aimed at developing PCR assays [20] emphasize the importance of including quality controls in PCR reactions for both VL and CL diagnosis, particularly in developing countries where retesting (whenever necessary) samples may be costly. For example, in the aforementioned study, the internal control (IC) was not detected in 33% of the samples tested, demonstrating losses in terms of reliability due to poor quality samples [20]. These results also indicate the necessity for high quality control of each individual sample to assess possible losses of minimal amounts of the target parasite’s DNA.

The continuous refinement of technologies and the increasing demand for rapid and efficient diagnostic tools is leading to the overall reduction of costs, making PCR-based methods more accessible for their application in laboratory routines [21]. Therefore, to refine the molecular diagnosis of leishmaniasis, this study presents two triplex PCR assays in order to provide, in a single reaction, the pathogen detection, the evaluation of the sample quality and of the DNA extraction process. The method presented may be adapted for the molecular diagnosis of any infectious disease, providing fast and reliable results.

Methods

Samples

Samples from dogs and humans living in a non-endemic area, apparently healthy and negative for VL and CL using conventional PCR and qPCR [15,17] were used as negative controls in the optimization and validation processes [22]. Samples known to be positive were obtained by the addition of genomic DNA from *L. infantum* (MHOM/TN/1980/IPT1) or *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) to DNA extracted from healthy dogs and humans.

A total of 186 blood samples collected from dogs from Passira (07°59'42" S, 35°34'51" W), a municipality of Pernambuco state, north-eastern Brazil were used for evaluating the accuracy of the tests developed. Samples were collected during house-to-house visits and the combined results from conventional PCR and qPCR were used as gold standard to determine whether these dogs were infected or uninfected.

Ethics statement

Animal owners provided written consent to have their animals sampled. All adult subjects provided signed a term of consenting their participation, and a parent or guardian of any child participant signed informing consent on their behalf. This research was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA / FIOCRUZ, Brazil) (License LW-41/10). The work has also been submitted to and approved by the Ethics Committee (CEP) of Aggeu Magalhães Research Center FIOCRUZ, Brazil, approval numbers: 42/2010 and 22/2011.

DNA extraction

The extraction of DNA from blood samples was performed with the Illustra blood genomicprep mini spin kit (GE Healthcare, New York, USA), following the manufacturer's instructions. The method basically comprises 3 steps (cell lysis, washing out impurities and elution of the DNA). For the optimization of triplex PCR reactions, the external control was added after cell lysis to estimate loss during the washing and elution steps.

Leishmania detection systems

Due to the high sensitivity and specificity obtained in qPCR assays, the LINF1B and protocols recently designed and validated for *L. infantum* and *L. (V.) braziliensis* detection [15, 17], respectively, were optimized for conventional PCR.

Internal control (IC)

The amplification of mammalian *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* gene (G3PD) was chosen as IC to determine DNA degradation and PCR inhibitors present in the blood samples [20].

External control (EC)

Due to the amplicon sizes and melting temperature of the LINF1B or kDNA1 and G3PD, an exogenous DNA sequence was selected to determine DNA losses during extraction. For its ease of retrieval and the large phylogenetic distance from *Leishmania* spp., the yeast *Malassezia pachydermatis* was assessed as a potential EC. The ITS-1 (internal transcribed spacer) region (~285 bp) of *M. pachydermatis* was amplified using 5.8SR1 and 18SF1 primers and genomic DNA extracted from a cultured reference strain (CD50), as previously described [23].

Triplex PCR reaction optimization

The triplex reactions formed with the addition of EC were preliminarily tested in samples known to be positive and negative for VL and CL, retaining the reaction and cycling conditions standardized by Gonçalves and co-workers [20]. To optimize the simultaneous detection of the three targets, when necessary, changes were made to the melting temperature and concentration of reagents. The detection limits of the EC and of the aetiological agents in the triplex reactions were determined by the addition of a 10-fold serial dilution (from 0.1 fg to 1 ng) of genomic DNA of *M. pachydermatis* and *L. infantum* / *L. (V.) braziliensis*, in blood samples from healthy individuals during the extraction process.

Amplicons were resolved by electrophoresis on 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide (10 mg / mL), using the 100 bp DNA Ladder (GibcoBRL-Life Technologies, MD, USA) as molecular weight marker. For the analysis, interpretation and documentation of the qPCR results, ABI PRISM 7500 SDS software (version 1.4) was used.

Sequencing

The amplicons obtained from the triplex PCR reactions were purified (illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit, GE Healthcare, New York, USA) and sequenced using a BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (version 3.1) (Applied Biosystems) in an automated sequencer (ABI 3100 Genetic Analyzer). Sequences were determined in both directions (using the same primers individually as for the PCR) and the electropherograms verified by eye. Sequences obtained were compared with those available in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides (BLASTn).

Sensitivity, specificity and efficiency

Results of the new tests were compared to the gold standards and concordant results were considered as true positive (TP) or negative (TN). Discordant results were considered as false positive (FP) and negative (FN). Then, the sensitivity (S), specificity (E) and efficiency (e) of the new PCR protocols were calculated using 2x2 contingency tables, and the following formulae: $S = TP / TP + FN$; $E = TN / TN + FP$ and $e = TP + TN / n$ [24].

Double-blind trials

A double-blind diagnosis of the aforementioned field-collected samples was performed by conventional and real-time PCR protocols (LINF 1B and kDNA1 uniplex PCRs) (observer 1) and triplex PCR for detection of VL (tVL) or triplex PCR for detection of CL (tCL) (observer 2). The concordance between the tVL *versus* LINF 1B PCR / qPCR results and tCL *versus* kDNA1 PCR / qPCR results was assessed using kappa (k) statistic calculation and judged as $k = 0.0$, poor; $0.0 \leq k \leq 0.20$, slight; $0.21 \leq k \leq 0.40$, modest; $0.41 \leq k \leq 0.60$, good; $0.61 \leq k \leq 0.80$, excellent and $0.81 \leq k \leq 1.00$, perfect agreement between tests [25]. The level of significance was set at $p < 0.05$. Statistical analysis was done using BioEstat 5.0 software.

Results

After adjustments of reagent concentrations (e.g., increasing dNTP and magnesium concentrations) and cycling conditions (decrease of melting

temperatures) both tVL and tCL were able to differentiate *Leishmania* positive and negative samples by amplification of the *L. infantum* or *L. (V.) braziliensis* kDNA simultaneously with EC and IC (Figure 1). Table 1 summarizes the settings of the two reactions optimized. The tVL was able to detect up to 10 pg of EC DNA and showed a detection limit of 1 fg of *L. infantum* genomic DNA. The analytical sensitivity of tCL for the EC and *L. (V.) braziliensis* targets were 100 fg and 10 pg, respectively.

Confirming the specificity of the primers for the correct targets in the triplex reactions, amplicons obtained with the IC primer set obtained high similarity (75%) with a sequence of G3PD or GAPDH human X-linked pseudogene [GenBank: X01111.1]. The *in silico* analysis of the compatible sequences with primers 18SF1 and 5.8SR1 for EC, showed no similarity to sequences of the genus *Leishmania*. BLAST analysis of amplicons obtained by kDNA1 protocol showed 94% similarity with *L. (V.) braziliensis* strain MHOM/BR/75/M2904 [GenBank: FR799010.1]. Amplicons obtained by LINF 1B detection showed similarity of 100% with a *L. infantum* sequence available in GenBank [Genbank: AF291093.1].

The diagnostic systems developed achieved a good balance between sensitivity and specificity. When considering as valid the results in the samples on which IC or EC were not detected, the tVL obtained $S = 78.68\%$, $E = 86.48\%$ and $e = 81.63\%$ while for tCL was $S = 78.26\%$, $E = 88.09\%$ and $e = 82.95\%$, as compared with the gold standard. Eliminating the low-quality samples (15.05%), in which IC and/or EC were PCR negative, the validity indicators estimated were $S = 78.68\%$, $E = 85.29\%$ and $e = 81.05\%$ for tVL, whereas $S = 97.29\%$, $E = 79.16\%$ and $e = 90.16\%$ for tCL. The positivity on the 98 and 88 samples tested by tVL and tCL, respectively, are shown in Figure 2.

Results obtained by tVL showed good agreement ($k = 0.62$, $p < 0.0001$) with the gold standard. Eliminating the low quality samples, the results among these techniques showed $k = 0.60$ ($p < 0.0001$). The level of concordance between tCL and gold standard ($k = 0.66$, $p < 0.0001$) increased to $k = 0.78$ ($p < 0.0001$) when low quality samples were excluded.

Discussion

To increase the diagnostic capacity of PCR, this study describes two triplex PCR assays designed for the molecular diagnosis of leishmaniasis in humans and dogs, by using external and internal controls to determine losses of DNA during the extraction process or degradation during storage. Indeed, the use of internal controls has been proven very important to assess sample quality [20], which is fundamental for obtaining an accurate final molecular diagnosis. Incidentally, the application of external controls has been done in different kinds of sample and for distinct purposes [26,27].

In recent years, PCR has been established as the preferred method for *Leishmania* spp. diagnosis and species identification due to its higher sensitivity and short turnaround time [28] as compared to some traditional diagnostic tests (e.g., protozoal culturing). On the other hand, in developing countries, the use of PCR is still limited for economic reasons [29], mainly for the diagnosis of neglected diseases such as leishmaniasis.

Multiplex PCR assays may help to save time and reduce efforts of a diagnostic laboratory, without impairing the reliability of results. The simultaneous amplification of three targets in the two triplex reactions herein developed was obtained mainly by reducing the annealing temperature, as previously reported (for example, see Ref. [29]). Among the 41 true *L. (V.) braziliensis*-positive samples, 25 (60.9%) did not show EC amplification. This result occurred in samples with a high parasite load, which probably led to early consumption of reagents for *Leishmania* DNA amplification, as previously shown [30].

The tCL assay demonstrated reproducibility in *L. (V.) braziliensis*-negative samples. According to the manufacturer's handbook of the DNA purification kit used herein, losses from 20% to 30% of the genomic DNA in the silica-membrane may occur. During diagnostic procedures, even minimal losses may significantly affect the detection of parasite DNA, leading to incorrect diagnostic conclusions. The ability to detect minimal amounts of EC is in line with the concentration range of target DNA (*L. (V.) braziliensis* or *L. infantum*) that may be detected by the new developed protocols.

According to the EC detection limits obtained, losses equal or higher than 10 pg (tVL) and 100 fg (tCL) of genetic material from *Leishmania* spp. would be detected. In

this context, these new tools allow a better interpretation of PCR results and promote quality assurance of leishmaniasis diagnosis. In the same way, since commercial kits are commonly based on a similar principle, the method presented may be used to assess the quality of the diagnosis provided by different laboratories. Moreover, these protocols may be useful for the evaluation of different DNA extraction kits or protocols.

Considering competition between targets, analytical sensitivity would decrease in multiplex assays when compared with the uniplex PCR results. One of the positive aspects of our triplex PCR is that the tVL detection limit increased in relation to LINF 1B (10 fg) [15] in spite of the presence of IC and EC in the reaction. In addition, in both triplex assays, the 'cost-benefit' relationship is improved by ensuring the quality of results along with the simultaneous detection of *Leishmania* spp.

Correct diagnosis and characterization of the infecting parasite is pivotal for recommending the appropriate treatment protocol for both VL and CL [31]. In this context, the detection systems chosen can be applied in several areas where *L. infantum* (or *L. donovani*) and species of the subgenus *Viannia* are found, in agreement with results obtained with the LINF1B and kDNA1 qPCR assays [15,17].

For CL diagnosis, different sensitivity and specificity have been demonstrated for PCR assays with several molecular targets (S = 91% and E = 100% for *Lb* ITS1; S = 98.7% and E = 53.8% for kDNA) [32]. The kDNA PCR is considered to be the most sensitive method for diagnosing leishmaniasis since there are ~10,000 minicircles per parasite [33] and is therefore useful for diagnostic procedures. In contrast with the protocols evaluated by Benoussan and co-workers [32], the tCL demonstrated satisfactory specificity (79.16%) with high sensitivity (97.29%), using the kDNA as the main target. The tCL also showed better sensitivity than reported by Bruijn and Barker [34], for the uniplex B1/B2 PCR, which is widely used in research laboratories in Brazil. Marcussi and co-workers [35] presented the LBF1/LBR1 primers for identification of *L. (V.) braziliensis* with a detection limit of 50 ng of DNA in the reaction, which is in contrast with the one obtained with our tCL assay (10 pg).

In spite of the competition of targets (a known limitation of multiplex PCR assays), our protocols have shown equivalent or better detection limit and high accuracy, leading consequently to greater potential for diagnosing the infection. Incidentally,

Disch and co-workers [36] developed a duplex PCR for *L. donovani* complex with a 4.7 fg detection limit, which better than the limit reached by our tVL assay that has, however, one additional target sequence (EC). The balance between sensitivity and specificity found in tVL evaluation allows application of the proposed technique with different purposes in clinical practice. A PCR protocol was recently presented by Srivastava and others [37], which achieved a good balance between sensitivity and specificity (87.8% and 84%, respectively) using in field-collected samples. The method herein proposed is comparable, but with the advantage of better interpretation of PCR results.

The application of the triplex reactions in field samples clearly illustrated the importance of controlling DNA losses while performing a molecular diagnosis. Among the samples tested, poor DNA recovery resulted in 15.05% of IC and/or EC negativity. Indeed, nearly 1/6 of the samples were not fully reliable in determining the status of infection. Conversely, significant increases in sensitivity and agreement with the traditional PCR protocols were observed in tCL results, in which a higher number of samples were invalidated by the absence of IC and/or EC.

The good agreement calculated between tVL and tCL and their gold standards (i.e., PCR and qPCR combined results) indicated their usefulness in a similar way to uniplex reactions, with the guarantee of the accuracy of negative results. Accordingly, the two protocols developed in this study (tVL and tCL) may be successfully applied in routine diagnostic services in Brazil and elsewhere where VL and CL are endemic, by offering a fast and accurate diagnosis of these expanding, neglected diseases.

Acknowledgements

We appreciate Claudia Cafarchia's help by sending the *M. pachydermatis* material from the Department of Veterinary Medicine, University of Bari, Italy.

References

- 1 Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, et al., (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 7: e35671.
- 2 Hotez PJ, Brown AS (2009) Neglected tropical disease vaccines. Biologicals 37: 160–164.

- 3 Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Ehrlich SS, et al., (2007) Control of neglected tropical diseases. *New Eng J Med* 357: 1018–1027.
- 4 World Health Organization (2011) Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. Geneva: World Health Organization. Technical Report Series No. 949
- 5 Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, et al (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5: 873–882.
- 6 Otranto D, Dantas-Torres F, Caprariis D, Stanneck D, Di Paola G, et al., (2013) Prevention of canine leishmaniosis in a hyper-endemic area using a combination of 10% imidacloprid/4.5% flumethrin. *Plos One* 8: e56374.
- 7 Ashford RW (2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 269–1281.
- 8 Passos VM, Barreto SM, Romanha AJ, Krettli AU, Volpini AC, et al., (2001) Cutaneous leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte: clinical, laboratorial, therapeutic and prognosis features (1989–1995). *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 5–12.
- 9 Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD (2007) Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol* 145: 245–252.
- 10 Ikononopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, et al., (2003) Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol* 113: 99–113.
- 11 Ndao M (2009) Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009: 278246
- 12 Fisa R, Riera C, Gállego M, Manubens J, Portús M (2002) Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol* 99: 105–111.

- 13 Akhavan AA, Mirhendi H, Khamesipour A, Alimohammadian MH, Rassi Y, et al., (2010) *Leishmania* species: detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. *Exp Parasitol* 126: 552–556.
- 14 Bahk YY, Kim SA, Kim JS, Euh HJ, Bai GH, et al., (2004) Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. *Proteomics* 4: 3299–3307.
- 15 Paiva-Cavalcanti M, Brito MEF, Souza WV, Gomes YM, Abath FGC (2009) The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* in canine blood. *Vet J* 182: 356–358.
- 16 Basuni M (2011) A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. *Am J Trop Med Hyg* 84: 338–343
- 17 Paiva-Cavalcanti M, Dantas-Torres F, Gonçalves de Albuquerque SC, Morais RCS, Brito ME, et al., (2013) Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. *Mol Cell Probes* 27: 122–128.
- 18 Rodríguez-Cortés A (2010) *Leishmania* infection: laboratory diagnosing in the absence of a “gold standard”. *Am J Trop Med Hyg* 82: 251–256.
- 19 Miranda A, Saldaña A, González K, Paz M, Santamaría G, et al., (2012) Evolution of PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis and species identification using filter paper samples in Panama, Central America. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 106: 544–548.
- 20 Gonçalves SC, Régis-da-Silva CG, Brito MEFC, Brandão-Filho SP, Paiva-Cavalcanti M (2012) Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of leishmaniasis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 18: 188–197.
- 21 Yang S, Rothman RE (2004) PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis* 4: 337–348.
- 22 Sackett DL, Haynes RB (2007) Evidence base of clinical diagnosis: The architecture of diagnostic research. *BMJ* 324

- 23 Cafarchia C, Stefania LM, Testini G, Parisi A, Guillot J, et al., (2007) Molecular characterization of *Malassezia* isolates from dogs using three distinct genetic markers for nuclear DNA. *Mol Cell Probes* 21: 229–238.
- 24 World Organization for Animal Health (OIE) (2010) Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* OIE, Paris, France: 1–18.
- 25 Rosner B (2006) *Fundamentals of Biostatistics*, Sixth Edition. Duxbury Press, Boston.
- 26 Mumy KL, Findlay RH (2004) Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative-competitive PCR. *J Microbiol Methods*. 57:259 –268.
- 27 Alm EW, Zheng D, Raskin L (2000) The presence of humic substances and DNA in RNA extracts affects hybridization results. *Appl Environ Microbiol*. 66:4547–4554.
- 28 Tsukayama P, Núñez JH, Santos MDL, Soberón V, Lucas CM, et al., (2013) A FRET-based real-time PCR assay to identify the main causal agents of new world tegumentary leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e1956.
- 29 Elfrino EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE (2000) Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 13: 559–570.
- 30 Polz MF, Cavanaugh CM (1998) Bias in template-to-product ratios in multi-template PCR. *Appl Environ Microbiol* 64:3724–3730.
- 31 Goto H, Lindoso JA (2010) Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8: 419–433.
- 32 Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL (2006) Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 44: 1435–1439.
- 33 Disch J, Pedras MJ, Orsini M, Pirmez C, Oliveira MC, Castro M, Rabello A (2005) *Leishmania* (*Viannia*) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51: 185.
- 34 Brujin M, Barker DC (1992) Diagnosis of New World leishmaniasis: Specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop* 52: 45–58.

- 35 Marcussi VM, Marcussi LM, Barbosa-Tessmann IP, Lonardoni MVC, Silveira TGV (2008) *Leishmania (Viannia) braziliensis*: New primers for identification using polymerase chain reaction. *Exp Parasitol* 120: 300–305.
- 36 Dish J, Carlignone RB, Marciel F, Oliveira MC, Orsini M, et al., (2006) Single-step duplex kDNA-PCR for detection of *Leishmania donovani* complex in human peripheral blood samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 56: 395–400.
- 37 Srivastava P, Mehrotra S, Tiwary P, Chakravarty J, Sundar S (2011) Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. *PLoS ONE* 6: e 19304.

Figure legends

Figure 1. Triplex PCR assays optimized for simultaneous detection of *L. infantum* (tVL: 1 fg of *Li* and 10 pg of EC) or *L. (V.) braziliensis* (tCL: 10 pg of *Lb* and 100 fg of EC), internal control (IC) and external control (EC). (MM) Molecular marker: Product size was determined using 100 bp DNA Ladder (GibcoBRL-Life Technologies, MD, USA). NTC – no template control.

Figure 2. Diagram with PCR positivity data on three targets (*Leishmania infantum* (*Li*) or *Leishmania braziliensis* (*Lb*), internal control (IC) and external control (EC)). Significant loss of DNA during the extraction process was demonstrated in 3.06% (3 samples) and 28.4% (25 samples) of the results for visceral and cutaneous leishmaniasis, respectively. TN- True negatives; TP- True positives according to the gold standard adopted.

APÊNDICE E - Artigos não relacionados publicados no período

ARTICLE IN PRESS

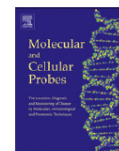
Molecular and Cellular Probes xxx (2013) 1–7



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular and Cellular Probes

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymcpr



Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans

Milena de Paiva Cavalcanti^{a,*}, Filipe Dantas-Torres^{a,b}, Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque^a, Rayana Carla Silva de Moraes^a, Maria Edileuza Felinto de Brito^a, Domenico Otranto^b, Sinalva Pinto Brandão-Filho^a

^a Department of Immunology, Aggeu Magalhães Research Centre, Oswaldo Cruz Foundation, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil

^b Department of Veterinary Medicine, University of Bari, 70010 Valenzano, Italy

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 November 2012
Accepted 30 January 2013
Available online xxx

Keywords:
Molecular targets
Diagnosis
Leishmania spp.
Real time PCR

ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* is a neglected disease of humans in the New World that may also cause irreversible skin and eventually mucocutaneous lesions. This parasite can also infect dogs and represents a diagnostic challenge for veterinarians. Methods currently available for the diagnosis of ACL have a low sensitivity and may be time-consuming, representing a limit for treatment expedition of ACL. Quantitative real time PCR assays (qPCR) for the detection of *L. (V.) braziliensis* in canine blood samples were developed herein, and the detection limit and specificity of different molecular targets (kDNA and rDNA) evaluated. Of the protocols assessed, two qPCR assays, one targeting the kDNA and other the SSU rDNA of *L. (V.) braziliensis*, performed better, with detection limits of 100 fg and 10 pg, respectively. These assays were also used to test skin samples from humans with suspected ACL. The results indicate that the qPCR protocols developed represent an advance for the diagnosis of ACL in dogs and humans from this region, and provide a rapid and non-invasive diagnosis of the infection by *L. (V.) braziliensis*. Considering the quantitative nature of the assays, they will also be useful for monitoring treatment efficacy and preventing relapses in human patients in Brazil, although further studies are needed to critically evaluate the specificity of the qPCRs for their capacity to distinguish different *Leishmania* species and subspecies (represented by zymodemes) in other countries. Finally, molecular assays established may represent new tools for future basic and applied research focused on species identification, host–parasite associations, and infection dynamics in host and vector populations.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis are a complex of diseases caused by parasitic protozoa (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) of the genus *Leishmania*, which are transmitted to animals and humans by phlebotomine sand fly vectors [1]. The clinical presentation of the disease may vary according to the causative agent and host immune response [2]. Thus, the identification of the *Leishmania* species involved in each case is central to undertaking a particular treatment protocol.

In Brazil, cutaneous leishmaniasis or American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a common disease of dogs and humans, with autochthonous cases in all geographical regions [3]. Indeed, the most widespread *Leishmania* species causing cutaneous leishmaniasis in dogs and humans in the New World is *Leishmania (Viannia) braziliensis* [2,4], which may be transmitted by many phlebotomine sand fly species [5]. The diagnosis of ACL is often performed by means of clinical, epidemiological, and laboratory analysis. However, the wide range of clinical signs impairs the clinical diagnosis, making it not always easy to perform [3]. In the same way, classical diagnostic techniques, including direct parasitological examination, leishmanin skin test, parasite isolation in culture media, and detection of anti-*Leishmania* antibodies by serological methods [2,6,7] may be time-consuming and subjective, often lacking in sensitivity and cross-reactions may occur.

Molecular tools may assist in overcoming common limitations presented by classical diagnostic techniques. In addition to

* Corresponding author. Department of Immunology, Aggeu Magalhães Research Centre, Oswaldo Cruz Foundation, Av Prof Moraes Rego, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil. Tel.: +55 81 21012679; fax: +55 81 21012640.
E-mail addresses: mp@cpqam.fiocruz, milena.cavalcanti@bol.com.br (M. de Paiva Cavalcanti).

Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR

Rayana Carla Silva de Morais · Suênia da Cunha Gonçalves ·
 Pietra Lemos Costa · Kamila Gaudêncio da Silva · Fernando José da Silva ·
 Rômulo Pessoa e Silva · Maria Edileuza Felinto de Brito ·
 Sinval Pinto Brandão-Filho · Filipe Dantas-Torres ·
 Milena de Paiva-Cavalcanti

Received: 6 August 2012 / Accepted: 13 September 2012
 © Springer Science+Business Media Dordrecht 2012

Abstract Visceral leishmaniasis (VL) is a parasitic disease caused by *Leishmania infantum*, which is primarily transmitted by phlebotomine sandflies. However, there has been much speculation on the role of other arthropods in the transmission of VL. Thus, the aim of this study was to assess the presence of *L. infantum* in cats, dogs and their ectoparasites in a VL-endemic area in northeastern Brazil. DNA was extracted from blood samples and ectoparasites, tested by conventional PCR (cPCR) and quantitative real time PCR (qPCR) targeting the *L. infantum* kinetoplast DNA. A total of 280 blood samples (from five cats and 275 dogs) and 117 ectoparasites from dogs were collected. Animals were apparently healthy and not previously tested by serological or molecular diagnostic methods. Overall, 213 (76.1 %) animals and 51 (43.6 %) ectoparasites were positive to *L. infantum*, with mean parasite loads of 795.2, 31.9 and 9.1 fg in dogs, cats and ectoparasites, respectively. Concerning the positivity between dogs and their ectoparasites, 32 (15.3 %) positive dogs were parasitized by positive ectoparasites. The overall concordance between the PCR protocols used was 59.2 %, with qPCR being more efficient than cPCR; 34.1 % of all positive samples were exclusively positive by qPCR. The high number of positive animals and ectoparasites also indicates that they could serve as sentinels or indicators of the circulation of *L. infantum* in risk areas.

R. C. S. de Morais · S. C. Gonçalves · P. L. Costa · F. J. da Silva · R. P. Silva ·
 M. E. F. de Brito · S. P. Brandão-Filho · F. Dantas-Torres · M. de Paiva-Cavalcanti (✉)
 Department of Immunology, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Prof.
 Moraes Rego s/n, Recife, PE 50670-420, Brazil
 e-mail: mp@cpqam.fiocruz.br

K. G. da Silva
 Federal Rural University of Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros s/n,
 Recife, PE 52171-900, Brazil

F. Dantas-Torres
 Department of Veterinary Medicine, University of Bari,
 Strada Provinciale per Casamassima km 3, 70010 Valenzano, BA, Italy



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Short communication

Detection and quantification of *Leishmania braziliensis* in ectoparasites from dogs

Rayana Carla Silva de Moraes^{a,b}, Suênia da Cunha Gonçalves-de-Albuquerque^a,
Rômulo Pessoa e Silva^a, Pietra Lemos Costa^a, Kamila Gaudêncio da Silva^b,
Fernando José da Silva^a, Sinval Pinto Brandão-Filho^a, Filipe Dantas-Torres^{a,c},
Milena de Paiva-Cavalcanti^{a,*}

^a Department of Immunology, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Prof. Moraes Rego s/n, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil

^b Federal Rural University of Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros s/n, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil

^c Department of Veterinary Medicine, University of Bari, Str. Provinciale per Canosastrada km 3, 70010 Valenzano, Bari, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2013

Received in revised form 18 March 2013

Accepted 21 March 2013

Keywords:

Ectoparasites

Dogs

Leishmania braziliensis

PCR

Real time PCR

ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a disease caused by different species of *Leishmania* protozoa, *Leishmania braziliensis* being the main species found in Brazil. In this study, two rural areas in Pernambuco, northeastern Brazil, where ACL is endemic, were selected. Genomic DNA was extracted from canine ectoparasites (ticks, fleas, and lice) and tested using a conventional PCR and a quantitative real time PCR. A total of 117 ectoparasites were collected, being 50 (42.74%) of them positive for *L. braziliensis* (in at least one PCR protocol), with a mean parasite load of 14.14 fg/μL. Furthermore, 46 (92.00%) positive ectoparasites were collected from positive dogs and 4 (8.00%) from negative ones. This study reports the detection of *L. braziliensis* DNA in ectoparasites, but does not prove their vector competence. Certainly, experimental transmission studies are necessary to assess their role, if any, in the transmission of *Leishmania* parasites to dogs.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

American cutaneous leishmaniasis (ACL) constitutes an important public health problem, whose control is difficult to achieve. In Brazil, ACL is on the rise, with autochthonous cases of human infection by *Leishmania braziliensis* in all Brazilian regions (Brito et al., 2012). The difficulties in controlling ACL may be related to the complex epidemiology of this disease, which involves the participation of different vector species, different wild and domestic animal hosts (small rodents, marsupials, dogs, cats, and horses)

and humans as well, that interact in different kinds of environments (e.g., primary forests, human houses, and crop plantations).

In spite of the numerous reports of natural infection by *L. braziliensis* in dogs, their role in the life cycle of this parasite has not been clarified yet (Brandão-Filho et al., 2011). In recent years, there has been a growing scientific interest about the possible role of ectoparasites in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis (Coutinho et al., 2005; Solano-Gallego et al., 2012), but their actual importance, if any, in the transmission cycle of *Leishmania infantum* remains unknown (Dantas-Torres, 2011).

In the present study, we assessed the presence of *L. braziliensis* in canine ectoparasites collected in the framework of a previous study (Moraes et al., 2013) carried out in northeastern Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +55 81 21012679; fax: +55 81 21012640.
E-mail address: milena.cavalcanti@bol.com.br,
mp@cpqam.fiocruz.br (M.d. Paiva-Cavalcanti).

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-1/11

Certificamos que o protocolo (P-50/10-5), intitulado "POPULAÇÃO DE ECTOPARASITOS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SUA RELAÇÃO COM A EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES EM PERNAMBUCO", de responsabilidade de MILENA DE PAIVA CAVALCANTI, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 13/12/2012 e inclui o uso total de :

Canis familiaris

- 200 Machos.

- 200 Fêmeas.

Felis sylvestris catus

- 100 Machos.

- 100 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2010

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

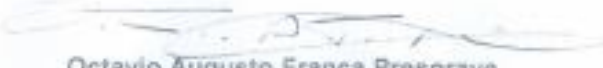
TERMO ADITIVO AO CERTIFICADO DA LICENÇA Nº LW-1/11 (P-50/10,5)

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FIOCRUZ, em atenção à solicitação da Dr^a. Milena de Paiva Cavalcanti autoriza o presente aditivo conforme solicitação da proponente via carta s/nº, de 24 de agosto de 2012.

1. Prorrogação do prazo de validade da licença por um ano, sem acréscimo de animais.

Este aditivo tem validade até 13/12/2013.

Rio de Janeiro, 27 de agosto de 2012.


Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA/FIOCRUZ

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04628550

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 – Prédio da Expansão – sala 200 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Título do Projeto: “Padronização de PCR multiplex e padronização e validação de PCR multiplex em tempo real para diagnóstico das leishmanioses”.

Pesquisador responsável: Milena de Paiva Cavalcanti

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 15/06/2010

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 46/10

Registro no CAAE: 0041.0.095.000-10

PARECER Nº 42/2010

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 07 de julho de 2013. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 07 de julho de 2010.

Giselle Campozana Gouveia

 Giselle Campozana Gouveia
 Farmacêutica
 Coordenadora
 Msc. SIAPE 048315
 CPqAM / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 07/07/2011.



PARECER DE RELATÓRIO PARCIAL

Título: Padronização de PCR multiplex e padronização e avaliação de PCT multiplex em tempo real para o diagnóstico das leishmanioses

Pesquisador responsável: Milena de Paiva Cavalcanti

Instituição onde foi realizado o Projeto: CPqAM

Instituições Envolvidas: CPqAM/ FIOCRUZ

Data de aprovação do projeto no CEP/CPqAM: 07/07/2010

Data de apreciação do relatório parcial no CEP/CPqAM: 17/07/2013

Registro no CAAE: 0041.0.095.000-10

Prezada Dra., Milena de Paiva Cavalcanti

Após analisar o relatório parcial referente ao projeto em pauta na reunião do CEP/CPqAM que ocorreu dia 17 de julho de 2013, informamos que o referido relatório foi deferido, pois se encontra em concordância com a Resolução sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, número 196, de 10 e outubro de 1996 ([HTTP://www.cpqam.fiocruz.br/aggeu/doc/resolucao196-96.doc](http://www.cpqam.fiocruz.br/aggeu/doc/resolucao196-96.doc)).

O CEP/CPqAM defere também quanto à solicitação da pesquisadora responsável pelo projeto para prorrogação de prazo de conclusão do estudo, que fica alterada para 17 de julho de 2015

Recife, 17 de julho de 2013.

Janaina Campos de Miranda

Coordenadora CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Janaina Campos de Miranda
Pesquisadora em Saúde Pública
Coordenadora
Mat. SIAPE 464177
CEP/CPqAM/ FIOCRUZ

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cncam.fiocruz.br



Generated by CamScanner