

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

Rômulo Pessoa e Silva

**ESTRATÉGIAS PARA O APRIMORAMENTO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR
NA LEISHMANIOSE VISCERAL**

RECIFE

2015

RÔMULO PESSOA E SILVA

**ESTRATÉGIAS PARA O APRIMORAMENTO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR
NA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr.^a Milena de Paiva Cavalcanti

Co-orientadora: Dr.^a Maria Almerice Lopes da Silva

RECIFE

2015

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

S586e Silva, Rômulo Pessoa e.

Estratégias para o aprimoramento do diagnóstico molecular na leishmaniose visceral / Rômulo Pessoa e Silva. - Recife: s.n, 2015.

121 p. : ilus., graf., tab., mapas, 30 cm.

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

Orientadora: Milena de Paiva Cavalcanti.

Co-orientadora: Maria Almerice Lopes da Silva.

1. Leishmaniose cutânea - diagnóstico. 2. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real - métodos. 3. Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex – métodos. 4. Leishmania – isolamento & purificação. 5. Leishmania - classificação. I. Cavalcanti, Milena de Paiva. ths. II. Silva, Maria Almerice Lopes da. ths. III. Título.

CDU 616.993.161

RÔMULO PESSOA E SILVA

**ESTRATÉGIAS PARA O APRIMORAMENTO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR
NA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Valéria Rêgo Alves Pereira
Dept^o de Imunologia/CPqAM/FIOCRUZ

Dr^a Rosana de Albuquerque Montenegro
Dept^o de Imunologia/CPqAM/FIOCRUZ

Dr Fábio André Brayner dos Santos
Dept^o de Biologia Celular e Ultraestrutura/
CPqAM/FIOCRUZ

Dr^a Cássia Docena
Núcleo de Plataformas Tecnológicas/
CPqAM/FIOCRUZ

Dr^a Milena de Paiva Cavalcanti
Dept^o de Imunologia/CPqAM/FIOCRUZ

A todos que cultivam honestidade e amor em seu trabalho.

AGRADECIMENTOS

Por tudo, agradeço primeiramente a Deus.

Pela família que ganhei, que sempre me deu força e apoio para seguir pelos caminhos tortuosos que vida algumas vezes nos leva. Pela sua tolerância às minhas diferenças, pelos momentos de felicidade quando estamos juntos e principalmente pela paciência e compreensão à minha ausência.

Pelos meus pais Flávio José Silva e Saneli Pessoa Augusto, que mesmo em tempos difíceis, não abriram mão de me oferecer um estudo digno, o qual com a absoluta certeza não teria conseguido o que tenho hoje.

Pelas pessoas maravilhosas, amigos excepcionais. Todos acabaram tendo alguma influência positiva nessa caminhada. Por ter colocado em meu caminho uma pessoa chamada Milena de Paiva Cavalcanti, minha orientadora, a quem eu devo um montante cada vez maior e impossível de pagar. Alguém que me trouxe luz quando pensava estar vendo apenas a escuridão. Serei eternamente grato pela confiança e pela oportunidade!

Pelas colegas de equipe que ganhei: Suênia da Cunha Gonçalves-de-Albuquerque e Rayana Carla Silva de Moraes, as quais sempre se mostraram solícitas para tirar dúvidas e ajudar em qualquer momento. Por Lays Adrienne Mendonça Trajano Silva, minha co-orientanda, com quem dividi inúmeras horas nos fins de semana realizando experimentos que nem sempre deram certo (os controles negativos que o digam...). Com elas aprendi, aprendo e com certeza continuarei aprendendo muito. Também por todos os colegas de laboratório que me apoiam e me incentivam.

Agradeço, também:

Ao CPqAM – FIOCRUZ, PE e Departamento de Imunologia por permitir o uso de suas instalações físicas.

Ao Dr. Sinval Pinto Brandão Filho, por reconhecer as necessidades do trabalho e colocar à disposição as ferramentas para a sua realização.

À minha chefe Andreia Silva e meus colegas de trabalho do Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Milton Bezerra Sobral (LACEN/PE), pelo apoio e compreensão nos momentos que precisei me ausentar, para que este trabalho pudesse ser melhor construído.

À FACEPE, ao Ministério da Saúde, ao CNPq/PAPES VI e à SES/PE, pelo apoio financeiro.

Obrigado!

"Qualquer trabalho de certa importância exerce uma influência ética. O esforço de concentrar e formar harmonicamente dada matéria é uma pedra que cai em nossa vida psíquica; do pequenino círculo, muitos outros mais amplos se propagam. "

Friedrich Nietzsche

SILVA, Rômulo Pessoa e. **Estratégias para o aprimoramento do diagnóstico molecular na leishmaniose visceral**. 2015. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*. O trabalho teve como objetivo avaliar estratégias para o aprimoramento do diagnóstico molecular na LV, que compreenderam a avaliação da eficiência de diferentes métodos de extração de DNA em amostras de urina; a análise do uso da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) como ferramenta para a detecção do DNA de *Leishmania infantum* na referida amostra; e a padronização de uma reação duplex qPCR para a detecção simultânea do DNA de *L. infantum* e do gene G3PD (controle endógeno). Depois da escolha do protocolo de extração de DNA mais apropriado, e após a otimização e a análise de reprodutibilidade, uma qPCR em urina foi padronizada. Em paralelo, após o desenho e a síntese de sondas TaqMan® compatíveis com os sistemas LINF 1B e G3PD1, após otimização e análise de reprodutibilidade, uma duplex qPCR em sangue também foi padronizada. Para avaliação dos protocolos desenvolvidos foram utilizadas técnicas de estatística descritiva. Para análise comparativa com técnicas clássicas de diagnóstico da LV utilizou-se Teste Qui Quadrado de independência ou Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Como resultados, após otimização, o limite de detecção alcançado pela qPCR em urina utilizando o protocolo de extração selecionado (kit comercial) foi de 5 fg/ μ L de amostra (ou ~ 0,034 parasitos). A duplex qPCR em sangue alcançou um limite de detecção de 2×10^2 fg/ μ L de amostra (ou ~ 1,4 parasito), após a otimização. A partir dos dados estatísticos obtidos, pôde-se analisar alta concordância percentual entre a qPCR e urina e o conjunto de critérios diagnósticos (sorologia rK39 + qPCR em sangue), bem como entre a duplex qPCR em sangue e a qPCR em sangue, para os Grupos 01 (pacientes com suspeita de LV) e 02 (pacientes HIV positivos co-infectados ou não). Como um conjunto de critérios, os dois novos ensaios obtiveram excelentes concordâncias com o conjunto de técnicas clássicas: 88,89% e 94,74% para os Grupos 01 e 02, respectivamente. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os testes. Pôde-se concluir que ambos os ensaios mostraram bom potencial para a incorporação, após validação, ao diagnóstico da LV; em conjunto ou individualmente (quando necessário), trazendo mais conforto, praticidade, confiabilidade e rapidez ao diagnóstico definitivo da patologia.

Palavras chaves: Leishmaniose visceral; diagnóstico; PCR em tempo real; urina; extração; PCR multiplex; controle de qualidade.

e. **Strategies for improving the molecular diagnosis of visceral leishmaniasis.** 2015. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

ABSTRACT

The visceral leishmaniasis (VL) is a parasitic disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*. This work aimed to evaluate strategies for the improvement of the molecular diagnosis of VL, which included the evaluation of different DNA extraction protocols efficacy for urine samples; the analysis of real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) as a tool for the detection of *Leishmania infantum* DNA in the aforementioned specimen; and the standardization of a duplex qPCR for the simultaneous detection of *L. infantum* DNA and the G3PD gene (endogenous control). After choose the most appropriate DNA extraction protocol (commercial kit), and after optimization and reproducibility analysis, a qPCR assay for urine samples was standardized. In parallel, following the design and synthesis of new TaqMan[®] probes targeted to LINF 1B and G3PD1 sets, and after optimization and reproducibility analysis, a duplex qPCR for blood samples was also standardized. For evaluation of the developed protocols, descriptive statistics were used. For comparative analysis with classical techniques of diagnosis, Chi Square Test of independence or Fisher's Exact Test ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) were used. As results, after optimization and using the extraction protocol previously selected (commercial kit), the detection limit reached by qPCR for urine was 5 fg/ μ L of sample (or ~ 0.034 parasites). The detection limit reached by duplex qPCR in blood was 2×10^2 fg/ μ L of sample (or ~ 1.4 parasite), after optimization. From the statistical data obtained, a high percentage concordance between the qPCR for urine and the set of diagnostic criteria (serology rK39 + qPCR in blood) as well as between the duplex PCR in blood and the qPCR in blood was observed, for both Groups 01 (patients suspected of having VL) and 02 (co-infected or not HIV positive patients). As set of criteria, the two new assays obtained excellent concordances with the set of classical techniques: 88.89% and 94.74% for Groups 01 and 02, respectively. There was no significant statistical differences between the tests. It was concluded that both assays showed good potential for the incorporation, after validation, to the VL diagnosis; together or individually (when necessary), bringing comfort, practicality, reliability and quickness to the definitive diagnosis of the pathology.

Keywords: Visceral leishmaniasis; diagnosis; real time PCR; urine; extraction; multiplex PCR; quality control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	21
Mapa 1 -	Países com casos registrados de leishmaniose visceral e/ou coinfeção LV/HIV até o ano de 1998.	24
Figura 2 -	Resumo-esquema do diagnóstico da leishmaniose visceral.	26
Figura 3 -	Teste preliminar da qPCR utilizando DNA de <i>L. chagasi</i> (MHOM/BR/1974/PP 75) adicionado em urina, extraída por kit comercial.	44
Quadro 1 -	Características dos procedimentos de extração de DNA empregados em urina, para o diagnóstico da leishmaniose visceral por PCR quantitativa em tempo real.	45
Figura 4 -	Análise de reprodutibilidade referente à qPCR em urina.	46
Figura 5 -	Curva-padrão de <i>L. chagasi</i> (MHOM/BR/1974/PP 75), resultante do experimento de reprodutibilidade do ensaio qPCR em urina.	47
Quadro 2 -	Composição final do <i>master mix</i> e condições de ciclagem do ensaio de qPCR em amostras de urina.	47
Quadro 3 -	Características das sondas TaqMan [®] A e B, desenhadas para o sistema LINF1 B e G3PD1, para composição de ensaios duplex qPCR, respectivamente.	48
Quadro 4 -	Análise de especificidade entre a sonda B e o gene G3PD de mamíferos.	48
Figura 6 -	Amplificação do DNA genômico de <i>L. chagasi</i> (MHOM/BR/1974/PP75) pelo sistema de <i>primers</i> LINF 1B a 2 pmol/μL, utilizando a sonda A entre as concentrações de 0,5 e 2,5 pmol/μL.	49
Figura 7 -	Amplificação do DNA genômico de <i>H. sapiens</i> pelo sistema de <i>primers</i> G3PD1, a 3 pmol/μL, utilizando a sonda B entre as concentrações de 0,5 e 2,5 pmol/μL.	49

Figura 8 -	Análise de reprodutibilidade da duplex qPCR.	50
Figura 9 -	Curva-padrão de <i>L. chagasi</i> (MHOM/BR/1974/PP 75), resultante do experimento de reprodutibilidade do ensaio duplex qPCR em sangue.	51
Quadro 5 -	Composição final do <i>master mix</i> e condições de ciclagem da nova duplex qPCR otimizada para a detecção simultânea do kDNA de <i>L. infantum</i> e do gene constitutivo G3PD de mamíferos.	51
Quadro 6 -	Resumo das concordâncias percentuais obtidas através da análise entre as novas técnicas e as técnicas já consagradas pela literatura (de referência) para o diagnóstico da LV, utilizando amostras provenientes de diferentes Grupos de pacientes.	56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Pacientes com suspeita clínica de leishmaniose visceral (Grupo 01) definidos como positivos ou negativos para a LV, e o número de doses do Glucantime[®] recebidas pré-coleta de material biológico, bem como presença ou ausência de alteração dos níveis de marcadores séricos de função renal, ureia e creatinina. 43
- Tabela 2 -** Análise de concordância entre qPCR em urina e o conjunto de critérios, para o diagnóstico da LV em pacientes com suspeita clínica (Grupo 01), bem como em pacientes HIV positivos (Grupo 02) provenientes de hospitais de referência do estado de Pernambuco. 52
- Tabela 3 -** Análise de concordância entre qPCR em urina e conjunto de critérios para o diagnóstico da LV em pacientes com suspeita clínica (Grupo 01) e sem tratamento anti-*Leishmania*, provenientes de hospitais de referência do estado de Pernambuco. 53
- Tabela 4 -** Análise de concordância entre duplex qPCR e qPCR simples, para o diagnóstico da LV em pacientes com suspeita clínica (Grupo 01), bem como em pacientes HIV positivos (Grupo 02) provenientes de hospitais de referência do estado de Pernambuco. 54
- Tabela 5 -** Análise de concordância entre duplex qPCR e exame parasitológico, levando-se em consideração apenas os pacientes do Grupo 01 que foram submetidos ao diagnóstico (mielograma), provenientes de hospitais de referência do estado de Pernambuco. 54
- Tabela 6 -** Análise de concordância entre o conjunto de critérios composto pelos novos protocolos diagnósticos e o conjunto composto por técnicas de referência, para o diagnóstico da LV, a partir de amostras provenientes de pacientes com suspeita clínica (Grupo 01), bem como de pacientes HIV positivos (Grupo 02) provenientes de hospitais de referência do estado de Pernambuco. 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABI	<i>Applied Biosystems Incorporated</i>
aC	Antes de Cristo
AVL	<i>QiaAmp Viral Lysis</i>
BLASTn	<i>Nucleotide basic local alignment search tool</i> (Ferramenta de Pesquisa do Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia)
CA	<i>California</i>
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CF	Citometria de fluxo
CN	Controle negativo
CONEP	Comitê Nacional de Ética em Pesquisa
cPCR	<i>Conventional polymerase chain reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase convencional)
CPqAM	Centro de pesquisas Aggeu Magalhães
C_t	<i>Ciclo threshold</i>
DAT	<i>Direct agglutination test</i> (teste de aglutinação)
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ensaio de imunoadsorção ligado à enzima)
FAM	Corante fluorescente padrão Applied biosystems
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i> (transferência de energia de ressonância por fluorescência)
G3PD	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G3PD1	Sistema de <i>primers</i> para a detecção do gene G3PD de mamíferos
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
ICT	<i>Immunochromatographic card test</i> (teste imunocromatográfico)
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
IFI	<i>Indirect immunofluorescence</i> (Imunofluorescência indireta)
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> (Espaçador transcrito interno)
KAtex	<i>Latex agglutination test</i> (teste de aglutinação em látex)

kDNA	<i>Kinetoplast desoxyribonucleic acid</i> (DNA do cinetoplasto)
LAMP	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i> (Amplificação isotérmica mediada por loop)
LINF 1B	Protocolo de PCR para a detecção de <i>L. infantum</i>
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MEE	<i>Multilocus enzyme electrophoresis</i> (Eletroforese de enzimas multilocos)
NASBA	<i>Nucleic acid sequence-based amplification</i> (Amplificação baseada na sequência do ácido nucleico)
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i> (Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia)
nPCR	<i>Nested polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase tipo nested)
NPT	Núcleo de plataformas tecnológicas
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i> (Eletroforese de campo pulsante)
PKDL	<i>Post-kala-azar dermal leishmaniasis</i> (Leishmaniose dérmica pós calazar)
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase quantitativa)
R²	Coefficiente de determinação
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> (Polimorfismo de fragmentos de restrição)
rK39	<i>Recombinant protein K39</i> (Proteína recombinante K39)
R_n	<i>Normalized reporter</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucléico)
rRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucléico ribossomal)
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
snPCR	<i>Seminested polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase tipo seminested)
SRL	Serviço de referência em leishmaniose
SSU	<i>Small subunit</i> (Subunidade menor)

SUS	Sistema único de saúde
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
<i>T_m</i>	<i>Melting temperature</i> (temperatura de <i>melting</i>)
TM	<i>Trademark</i> (marca registrada)
USA	<i>United States of America</i> (Estados Unidos da América)
VIC	Corante fluorescente padrão Applied biosystems
\bar{X}	Média
<i>x g</i>	Unidade de força gravitacional
® (símbolo)	<i>Trademark</i> (marca registrada)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL	20
2.1 Caracterização da doença	20
2.2 Epidemiologia da LV no mundo e no Brasil	22
2.2.1 Coinfecção HIV/LV.....	23
2.3 Diagnóstico da LV	24
2.3.1 Diagnóstico molecular da LV.....	27
2.3.1.1 <i>Uso de amostras biológicas alternativas</i>	29
2.3.1.2 <i>Extração de DNA dos espécimes biológicos</i>	30
2.3.1.3 <i>Controles de qualidade amostral</i>	31
2.3.1.4 <i>Alvos moleculares</i>	32
3 OBJETIVOS	33
3.1 Geral	33
3.2 Específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Desenho do estudo	34
4.2 Amostragem	34
4.2.1 Obtenção das amostras.....	34
4.2.2 Diagnóstico de pacientes através do conjunto de critérios.....	34
4.3 Diagnóstico laboratorial	35
4.3.1 Diagnóstico parasitológico.....	35
4.3.2 Diagnóstico sorológico.....	35
4.3.3 Diagnóstico molecular.....	35
4.4 Coletas de amostras biológicas	35
4.4.1 Urina.....	36
4.4.2 Sangue.....	36
4.5 Processamentos das amostras	36
4.5.1 Construção das curvas de diluição.....	36
4.5.2 Extração de DNA em urina.....	37
4.5.3 Extração de DNA em sangue.....	37
4.6 Otimização da qPCR em urina	37

4.7 Análise de reprodutibilidade e documentação dos resultados.....	38
4.8 Desenvolvimento da duplex qPCR.....	38
4.8.1 Desenho das sondas TaqMan®.....	39
4.8.2 Otimização individual dos sistemas LINF 1B e G3PD1 com as respectivas sondas.....	39
4.8.3 Otimização dos sistemas LINF 1B e G3PD1 em conjunto.....	40
4.9 Avaliação das ferramentas diagnósticas.....	40
5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	42
6 RESULTADOS.....	43
6.1 Amostragem.....	43
6.2 Otimização da qPCR em urina.....	44
6.3 Desenvolvimento da duplex qPCR.....	47
6.3.1 Desenho das sondas TaqMan®.....	47
6.3.2 Otimização individual dos sistemas LINF 1B e G3PD1 com as respectivas sondas.....	48
6.3.3 Otimização dos sistemas LINF 1B e G3PD1 em conjunto.....	50
6.4 Avaliação das ferramentas diagnósticas.....	51
6.4.1 Teste de qPCR em amostras de urina.....	51
6.4.2 Teste de duplex qPCR em amostras de sangue.....	53
6.4.3 Avaliação das ferramentas como conjunto de critérios diagnósticos.....	55
7 DISCUSSÃO.....	57
8 CONCLUSÕES.....	64
9 PERSPECTIVAS.....	65
REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICE A - Termo de consentimento Livre e Esclarecido para Adulto.....	76
APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Menor de Idade.....	79
APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Grupo Controle.....	82
APÊNDICE D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: duplex qPCR.....	85
APÊNDICE E - Artigo submetido.....	86
APÊNDICE F - Artigo publicado 1.....	104
APÊNDICE G - Artigo publicado 2.....	110
APÊNDICE H - E-book pré aceito.....	117
ANEXO A - Parecer Comitê de Ética em Pesquisa.....	119

ANEXO B - Parecer Comitê de Ética em Pesquisa: duplex qPCR.....	120
ANEXO C - Parecer de Relatório Parcial/renovação CEP: duplex qPCR.....	121

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

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. A depender da espécie parasitária envolvida, a doença pode se apresentar nas seguintes formas clínicas: cutânea, mucocutânea, cutâneo-difusa (formas tegumentares) e visceral, sendo a última a mais severa. Estas formas clínicas diferem em distribuição geográfica, hospedeiro/vetor e em taxas de incidência e de mortalidade. No mundo, além dos milhões de novos casos registrados a cada ano, centenas de milhões de pessoas encontram-se sob o risco de contrair alguma das diferentes formas clínicas da enfermidade, e em diversos países do Novo e do Velho Mundo, a leishmaniose visceral (LV) é responsável pela ocorrência de milhares de mortes.

No Brasil, casos de LV são registrados em todas as cinco regiões, entretanto a região Nordeste se destaca pela grande incidência e ampla distribuição da doença, que acomete principalmente indivíduos de baixo poder aquisitivo residentes em comunidades localizadas em áreas rurais e periurbanas. Apesar dos dados epidemiológicos expressivos, a falta de atenção e interesse por parte das autoridades públicas para com a LV persiste, uma vez que investimentos para programas educacionais, desenvolvimento de novas drogas, vacinas ou novos métodos diagnósticos são insuficientes para a realidade atual da pesquisa e desenvolvimento científico. Dessa forma, a doença é classificada como um mal negligenciado.

Atualmente, o diagnóstico da LV é realizado pela associação de aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Entretanto, os métodos convencionais de diagnóstico laboratorial, que incluem testes sorológicos, cultura dos parasitos e microscopia, apresentam importantes limitações. O exame microscópico possui baixa sensibilidade, enquanto que a cultura, além de ser pouco sensível, é passível de contaminação e exige longo tempo para a liberação do resultado. Os métodos imunológicos são susceptíveis a reações cruzadas, não apresentam diferenciação entre infecção passada e presente, e a acurácia torna-se inferior em pacientes imunossuprimidos.

A aplicação de estratégias diagnósticas rápidas e confiáveis é de grande importância, uma vez que possibilitam um controle mais eficaz da doença, através da detecção precoce e pronta implementação da terapia, e também pela obtenção de perfis epidemiológicos que garantem um direcionamento mais preciso das medidas de controle. Neste contexto, a

biologia molecular tem se tornado relevante, devido ao contínuo desenvolvimento de ferramentas com ensaios cada vez mais rápidos, sensíveis e específicos. A Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase chain reaction* - PCR) e suas variações têm sido empregadas com êxito para a detecção do material genético de *Leishmania* spp. tanto em espécimes provindos de seres humanos quanto de cães.

Uma de suas variantes, a PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR), além de possuir maior rapidez, praticidade e segurança em relação à PCR convencional (cPCR), é um método capaz de fornecer importantes parâmetros, tais como a temperatura de *melting* (T_m), que auxilia a diferenciação entre espécies a partir do produto de amplificação, e a quantificação do DNA do agente etiológico envolvido, que permite o monitoramento da eficácia terapêutica e prevenção de recidivas, através da associação com a carga parasitária.

Uma vantagem que se aplica não só à qPCR mas à biologia molecular como um todo, é a possibilidade da utilização de uma grande variedade de amostras biológicas para o diagnóstico das diversas enfermidades infecto-parasitárias. Em relação às leishmanioses, punção de medula óssea, aspirado de baço e linfonodos, punção venosa e raspados epiteliais são espécimes comumente empregados. A característica invasiva inerente à obtenção das diferentes amostras tem promovido a busca por espécimes biológicos de fácil obtenção, tais como a urina, mais segura tanto para o paciente quanto para o profissional de saúde. Para indivíduos coinfectados HIV/LV, um diagnóstico confortável e confiável possui uma significância ainda maior, uma vez que os perfis clínicos heterogêneos, bem como a imunossupressão, tornam ainda mais desafiadora a detecção da enfermidade. Entretanto, ainda são poucos os trabalhos que fizeram uso desse espécime para o diagnóstico da LV, sendo a maioria direcionada para a detecção de *Leishmania* spp. em cães, através de cPCR ou qPCR.

Mesmo com a reduzida produção científica, os métodos de extração de DNA em urina são bastante divergentes em termos de processamento do espécime, e de forma geral não possuem adequabilidade à respectiva amostra. Portanto, o teste e a avaliação de diferentes procedimentos de extração são fundamentais para que seja incorporado o melhor e o mais viável método ao ensaio diagnóstico, tendo em vista a grande importância dessa etapa no ensaio molecular.

Ainda que tenha havido forte evolução na biologia molecular nos últimos anos, e que a mesma ofereça grandes vantagens sob a ótica diagnóstica, algumas deficiências da PCR persistem, tal como a possibilidade de reações falso-negativas pela presença de inibidores ou por amostras mal conservadas e degradadas. Portanto, o uso de controles de qualidade

amostral é fundamental na garantia de um resultado com margem mínima de erro. Esses controles baseiam-se na detecção de genes intrínsecos do espécime biológico.

O uso do controle endógeno também pode influenciar no resultado de pesquisas epidemiológicas, já que pode contribuir aumentando a confiabilidade do resultado negativo, evitando subnotificações e auxiliando no controle da LV em regiões de alta endemicidade; perfis epidemiológicos mais fidedignos podem resultar em um melhor direcionamento das medidas de controle. No entanto, comumente a avaliação da qualidade amostral é feita em ensaios separados, gerando mais custos e prolongando o tempo para a determinação do diagnóstico.

Desde o ano de 2008, a equipe de leishmanioses do departamento de imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM / FIOCRUZ) Pernambuco, vem trabalhando com o desenvolvimento, padronização e validação de ferramentas diagnósticas baseadas em qPCR para detecção e quantificação de *L. infantum* (sistema LINF 1B), apresentando excelentes resultados.

Diante do exposto, com base nas possibilidades que a biologia molecular oferece, o objetivo do presente estudo foi avaliar estratégias para o aprimoramento do diagnóstico molecular da LV, as quais compreendem a avaliação da eficiência de diferentes métodos de extração de DNA em amostras de urina; do método de qPCR como ferramenta diagnóstica, utilizando a urina para a detecção de pequenas quantidades do DNA de *Leishmania infantum* e, a padronização de uma reação duplex qPCR, capaz de detectar pequenas quantidades do DNA de *L. infantum*, e simultaneamente amplificar o gene Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PD) de mamíferos como controle de qualidade amostral.

As estratégias avaliadas neste estudo poderão, após uma etapa posterior de validação e em conjunto com critérios clínicos e epidemiológicos, contribuir para o controle e redução do número de casos da LV, bem como para a diminuição da coinfeção HIV/LV, uma vez que promovem a detecção precoce da infecção, com garantia da qualidade dos resultados.

2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 Caracterização da doença

As leishmanioses são um complexo de doenças antroponozoonóticas de importante espectro clínico e diversidade epidemiológica, endêmicas, consideradas um grande problema de saúde pública em diversas nações (BRASIL, 2007). Protozoários (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) intracelulares obrigatórios pertencentes ao gênero *Leishmania* são os responsáveis pelo desenvolvimento destas enfermidades. A transmissão ao homem se dá através da picada de insetos hematófagos, conhecidos como flebotomíneos (gênero *Lutzomyia*) e denominados popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (ALVAR, 2012; BRASIL, 2009, 2007; CHAPPUIS et al., 2007).

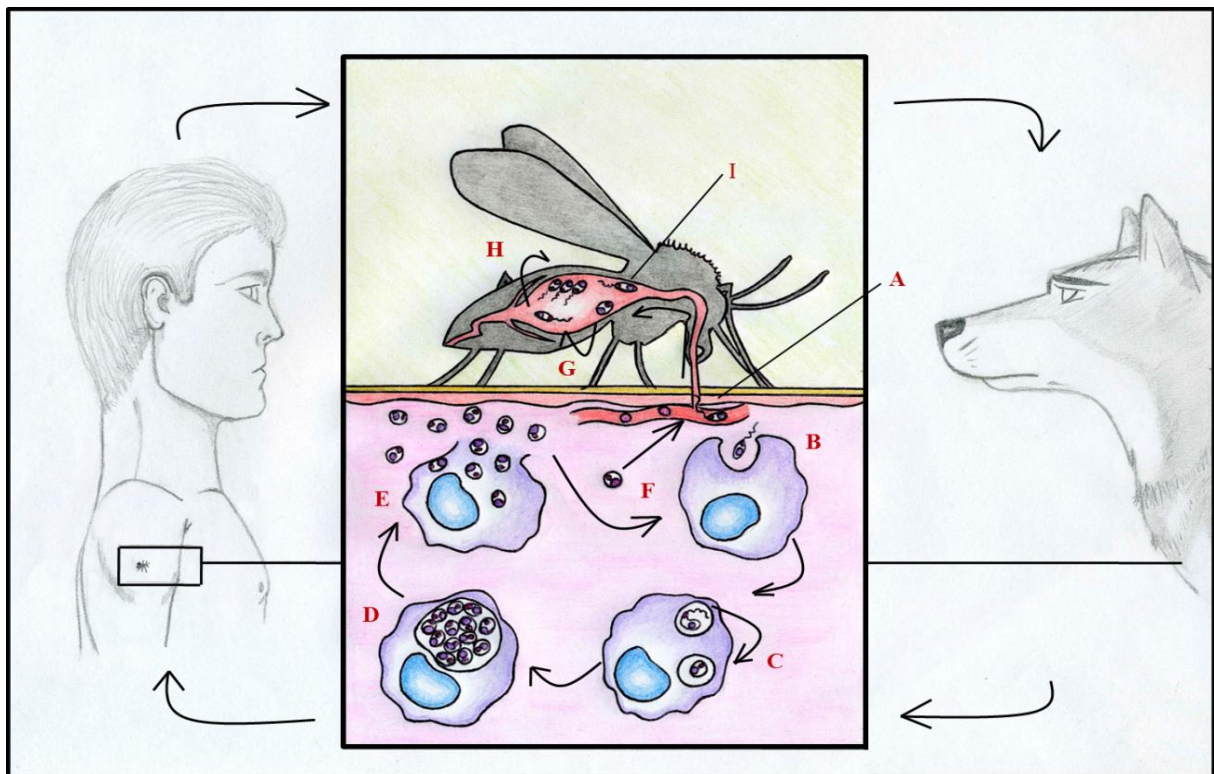
Várias formas clínicas podem ser observadas em indivíduos infectados, que vão se desenvolver a depender da espécie parasitária envolvida. As formas cutânea, mucocutânea e cutâneo-difusa caracterizam a Leishmaniose Tegumentar (LT), enquanto a forma visceral caracteriza a Leishmaniose Visceral (LV), a mais severa (NOAZIN et al., 2008; REITHINGER et al., 2007). Diferem ainda em distribuição geográfica, hospedeiro/vetor e taxas de incidência e de mortalidade (MARZOCHI; MARSDEN, 1991).

Atualmente são conhecidas 30 espécies de *Leishmania*, sendo 20 patogênicas ao homem (ASHFORD, 2000; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014a). As espécies que compõem o Complexo *donovani* estão associadas ao desenvolvimento da LV. No subcontinente Indiano (que inclui Índia, Bangladesh e Nepal), *L. donovani* é a principal espécie envolvida (ALVAR, 2012; ROMERO; BOELAERT, 2010). O principal agente causador nas Américas, bem como no Nordeste brasileiro, e de forma mais específica também no estado de Pernambuco, é *L. (L.) infantum* (sin. *L. chagasi*), (BRASIL, 2007). Em relação aos reservatórios de *L. infantum*, o cão doméstico, *Canis familiaris*, é o principal a assumir essa função em área urbana (NEVES, 2011).

No ciclo biológico, os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas metacíclicas são inoculadas pelas fêmeas dos insetos vetores, durante o repasto sanguíneo. A internalização de *Leishmania* se faz através da endocitose mediada por receptores na superfície do macrófago. Dentro da célula, ocorre a diferenciação das promastigotas metacíclicas em amastigotas. As amastigotas iniciam o processo de sucessivas

multiplicações. Na ausência do controle parasitário pela célula hospedeira, esta se rompe e as amastigotas liberadas serão internalizadas por outros macrófagos. A infecção para o hospedeiro invertebrado ocorre quando da ingestão, no momento do repasto sanguíneo em indivíduo ou animal infectado, das formas amastigotas. No trato digestivo do inseto, o parasito sofre sucessivas modificações, até que se transforma em promastigota metacíclica, a forma infectante (Figura 1), (NEVES, 2011; REY, 2008).

Figura 1 – Ciclo biológico de *Leishmania* spp.



Fonte: elaborado pelo autor, a partir de Neves (2011) e Rey (2008).

Legenda: Inicialmente, a fêmea do inseto hematófago conhecido como flebotomíneo, ou popularmente como mosquito-palha, ao realizar o repasto sanguíneo, inocula o parasito flagelado em sua forma infectante, a promastigota metacíclica, na pele do hospedeiro vertebrado (A). Por endocitose, macrófagos existentes nas proximidades englobam o parasito, após reconhecimento por receptores de superfície (B). No interior da célula, as promastigotas se diferenciam em formas esféricas conhecidas como amastigotas (C) e então se multiplicam sucessivamente (D). Na ausência do controle parasitário pela célula hospedeira, esta se rompe, liberando as amastigotas no meio (E), as quais poderão infectar outros macrófagos, ou serem ingeridas pelo hospedeiro invertebrado (F). No flebotomíneo, as formas amastigotas ingeridas transformam-se em promastigotas no intestino médio (G). Estas formas flageladas, após rápida multiplicação, se convertem nas promastigotas infectantes e migratórias (metacíclicas) (H). Do intestino, são regurgitadas ou introduzidas na pele do próximo hospedeiro quando o inseto faz um novo repasto sanguíneo (I, A). O cão está representado como o principal reservatório doméstico da leishmaniose visceral, entretanto outros animais como roedores e marsupiais possuem grande importância epidemiológica, principalmente para a leishmaniose tegumentar Americana (NEVES, 2011; REY, 2008).

Clinicamente, as leishmanioses são bastante diversas. A LT tem como manifestação

mais comum a lesão única ulcerada no local da picada do inseto vetor, e que tende à regressão espontânea. Entretanto, podem ocorrer disseminações para orofaringe e mucosa nasal, mas que compreendem até 2% dos casos (BRASIL, 2009). Já a LV é uma doença de difícil detecção clínica. É fatal se não tratada, e inclui sinais como febre, hepatoesplenomegalia e anemia (pancitopenia), características que podem ser facilmente confundidas com outras enfermidades, tais como leucemia, malária e febre tifoide (RAHMAN et al., 2010; THAKUR; KUMAR, 1992). Em muitos casos também pode permanecer assintomática (LE FICHOUX et al., 1999).

A LV, ou calazar, havia sido classificada como uma zoonose rural típica no Brasil, mas o que se observa a partir dos anos 80 é a sua emergência como um problema de saúde pública, expandindo-se a centros urbanos de diversas cidades, com diferentes padrões de desenvolvimento econômico e social (BRASIL, 2009; HARHAY et al., 2011). Nos últimos anos, o tratamento, o diagnóstico e a prevenção da LV têm sofrido avanços científicos significantes, que têm facilitado a implementação de programas de controle a nível nacional e regional. Todavia, a eficácia das estratégias ainda não é satisfatória, tornando necessário o investimento crescente em pesquisa (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

2.2 Epidemiologia da LV no mundo e no Brasil

As leishmanioses estão amplamente distribuídas a nível global. Indícios das patologias já foram historiados a mais de 2000 anos antes de Cristo. No antigo Egito, por exemplo, foram encontradas evidências de LV em múmias, datadas entre 2050 e 1650 aC (ZINK et al., 2006). A Organização Mundial da Saúde (2014a) estima que 310 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção em 98 países, de cinco continentes, com registro aproximado de 1,3 milhões de novos casos, das diferentes formas clínicas, sendo 300 mil pela LV a cada ano no mundo. Dentre as parasitoses, a LV está atrás apenas da Malária em número de mortes anuais, estando entre 20 e 40 mil (ALVAR et al., 2012).

Mais de 90% dos casos de LV reportados mundialmente estão concentrados em áreas rurais e suburbanas na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (CHAPPUIS et al., 2007; DESJEUX, 2004). Curiosamente, aproximadamente 67% da prevalência da LV mundial ocorre nos três países do subcontinente Indiano, com 40.000 casos/ano (CHAPPUIS et al., 2007). Desjeux (1996) demonstrou a propagação de regiões endêmicas e o aumento da incidência já na década de 90, apontando ainda uma possível substancial subnotificação dos

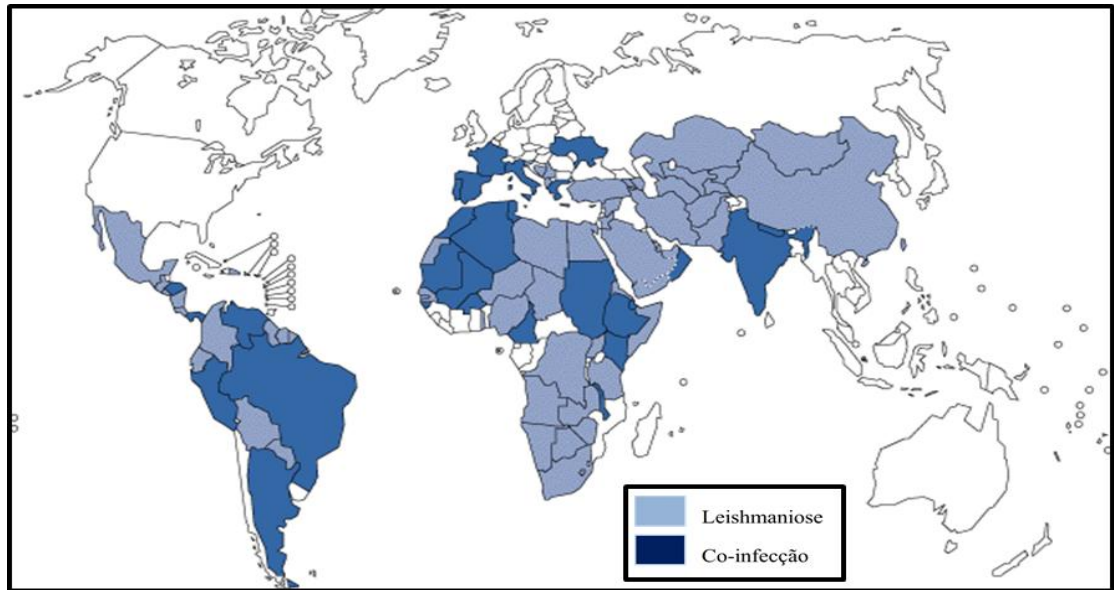
casos, já que a notificação compulsória ocorria em poucos países. Atualmente, este é um problema que persiste. No âmbito nacional, embora a subnotificação seja um problema constante, números elevados bem como surtos epidêmicos ainda são registrados em diversos estados no país (BRASIL, 2014a).

O Brasil, posicionado como o principal responsável pelos casos de LV registrados na América Latina, tem a doença classificada em seu território como endêmica e negligenciada (BRASIL, 2014a; ROMERO; BOELAERT, 2010). A enfermidade possuía inicialmente uma ocorrência limitada a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, mas, hoje, encontra-se em franca expansão. O Nordeste é a principal região afetada, com aproximadamente 53% dos casos; entre os anos 2000 e 2013, ocorreram 1.570 óbitos apenas na referida região, sendo Maranhão, Piauí e Ceará os estados com os maiores índices de mortalidade. Em Pernambuco, entre 2010 e 2013, o estado teve notificação de 194 casos, com letalidade de 9,28%, o que demonstra a grande importância epidemiológica da doença nesta unidade federativa (BRASIL, 2014b).

2.2.1 Coinfecção HIV/LV

A LV tem emergido como uma importante infecção oportunista associada ao vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus* – HIV), principalmente em regiões onde ambas as doenças são endêmicas, especialmente o Sudeste Europeu e a África. Devido à disseminação pandêmica do HIV durante os anos 90, o número de coinfeções reportadas cresceu rapidamente. Em adição, o crescimento das cidades e a integração cada vez maior com o campo têm sido fatores decisivos para a sobreposição das patologias (ALVAR et al., 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014b; SINHA; PANDY; BHATTACHARYA, 2005). Shafiei et al. (2014) apontaram em um recente estudo a emergência de casos de coinfeção no Irã (Oriente Médio), a partir da utilização de métodos de detecção imunológicos. No Mapa 1 estão apontados os países com registro de casos de LV e/ou HIV/LV até o ano de 1998. Além dos reportados na imagem, outros países como México e Angola também obtiveram registro da infecção simultânea (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014c).

Mapa 1 – Países com casos registrados de leishmaniose visceral e/ou coinfeção LV/HIV até o ano de 1998.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2014, tradução nossa).

Martins-Melo et al. (2014) descreveram o padrão de mortalidade associado à coinfeção no Brasil, entre os anos 2000 e 2011. De acordo com o estudo populacional de abrangência nacional, um total de 272 mortes durante este período foi atribuído à HIV/LV, maioria dos indivíduos infectados provenientes da região Nordeste. Os autores também alertam sobre a tendência crescente de mortalidade devido à coinfeção ao longo dos anos, bem como afirmam ser um crescente problema de saúde pública no país.

Pessoas HIV positivas são particularmente vulneráveis à LV. A doença acelera a replicação e a progressão do HIV para a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). O risco de insucesso no tratamento da LV aumenta, bem como as chances de recidivas. Além disso, a probabilidade do desenvolvimento da LV ativa é aumentada entre 100 e 2.000 vezes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014a). Acredita-se que o número de coinfeções registradas anualmente (2.000 em média) esteja significativamente abaixo da realidade, isso devido à subnotificações decorrentes da existência de limitações no diagnóstico clínico e laboratorial, bem como a carência de programas de busca ativa (ALVAR et al., 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007).

2.3 Diagnóstico da LV

O diagnóstico definitivo é de extrema importância para a implementação de um regime terapêutico adequado, bem como para o esclarecimento da epidemiologia da doença, uma vez que pacientes infectados podem atuar como reservatórios, contribuindo para a transmissão antroponótica (CHAPPUIS et al., 2007; KHAN et al., 2012). O diagnóstico é realizado pela junção de dados obtidos pela análise clínica, epidemiológica e laboratorial. Entretanto, como já discutido, o perfil clínico da LV é inespecífico (não patognomônico) e as estratégias diagnósticas de rotina, parasitológicas e sorológicas, apresentam significantes limitações.

O exame parasitológico baseia-se na demonstração microscópica das formas amastigotas em aspirado de medula óssea, e de tecidos linfóide e hepático, ou em cultura (BRASIL, 2014a; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). A necessidade do uso de amostras invasivas e de profissionais com vasta experiência (microscopia), o tempo de processamento e o risco de contaminação (cultura) são desvantagens inerentes a esse tipo de diagnóstico (COTA et al., 2012; IKONOMOPOULOS et al., 2003).

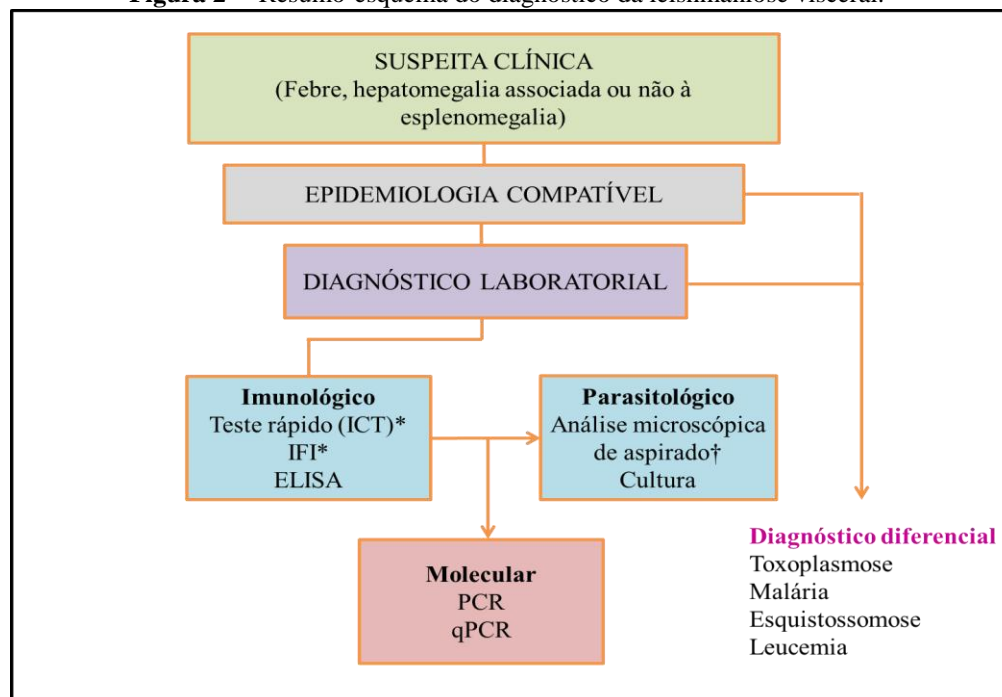
Os métodos sorológicos incluem o *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e a reação de Imunofluorescência indireta (IFI). O teste ELISA é bastante utilizado na rotina diagnóstica em humanos e cães e também em pesquisas epidemiológicas; possui alta sensibilidade, mas que varia a depender do antígeno empregado: A2, gp63, gp70 e gp72 são alguns exemplos; o antígeno recombinante K39 tem adquirido preferência pela sensibilidade e especificidade registradas em alguns estudos (GOMES et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2011a). A Imunofluorescência é a técnica mais convencional para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, porém devido à baixa especificidade, este método vem sendo usado em uma escala limitada (OLIVEIRA et al., 2013; SUNDAR; RAI, 2002).

Outros testes como o *Direct agglutination test* (DAT) e o imunocromatográfico rK39 (teste rápido) possuem alta sensibilidade, entretanto, assim como o ELISA e a IFI, podem não diferenciar entre infecção passada e presente (CHAPPUIS et al., 2007; SUNDAR; RAI, 2002). Outras limitações dessas técnicas incluem possibilidade de reação cruzada com outros parasitos da família Trypanosomatidae e perda de acurácia em pacientes imunossuprimidos, como aqueles coinfectados HIV/LV, em que os níveis de anticorpos podem estar baixos, ao ponto de não serem detectáveis (ALMEIDA et al., 2005; COTA et al., 2012; IKONOMOPOULOS et al., 2003).

A intradermorreação de Montenegro (IDRM), ao contrário do que acontece na LT, tem resultado geralmente negativo, não sendo assim recomendada a sua utilização (BRASIL, 2009). Há ainda a Citometria de Fluxo (CF), emergindo como uma importante tecnologia, mais sensível e específica que as outras ferramentas imunológicas (OLIVEIRA et al., 2013). Recentemente foi demonstrado o potencial de microesferas magnéticas adsorvidas com antígenos recombinantes associados com a CF, para auxiliar o diagnóstico clínico e subclínico em cães (SOUSA et al., 2013).

Apesar de alguns autores (HERWALDT, 1999; SRIVASTAVA et al., 2011a) considerarem o exame parasitológico como padrão-ouro, diante das restrições que englobam metodologias parasitológicas e sorológicas, não há ainda um método que possa ser classificado como tal para o diagnóstico da infecção por *L. infantum*. Há, portanto, a necessidade da consolidação de ferramentas diagnósticas de alta sensibilidade e especificidade, que possam contribuir para a detecção precoce em humanos e cães, e em estudos de prevalência. Neste contexto, técnicas de biologia molecular surgem como alternativa. A Figura 2 traz um resumo esquemático do diagnóstico da LV.

Figura 2 – Resumo-esquema do diagnóstico da leishmaniose visceral.



Fonte: elaborado pelo autor.

Nota: *: O *immunochromatographic card test* (ICT) é o método de escolha para a triagem na rotina diagnóstica, e a imunofluorescência indireta (IFI) o método confirmatório mais utilizado, de acordo com fluxograma estabelecido pelo Ministério da Saúde. †: Punção de medula, aspirado hepático, esplênico ou de linfonodos. Devido a restrições, o procedimento torna-se limitado para a rotina da LV (BRASIL, 2014a).

2.3.1 Diagnóstico Molecular da LV

Dentro da atual conjuntura diagnóstica e epidemiológica da LV, a biologia molecular tem se tornado cada vez mais relevante, com o desenvolvimento de técnicas moleculares inovadoras. Essas técnicas são reconhecidas pelas suas múltiplas aplicações e altas taxas de sensibilidade e especificidade, e têm sido recomendadas para o diagnóstico em humanos e cães (MOHAMMADIHA et al., 2013a; RIEIRA et al., 2004; STARK et al., 2006). A aplicabilidade do método de PCR é refletida no grande número de artigos publicados dentro desse contexto durante os últimos anos, mostrando bons resultados. As variações da PCR, como Nested PCR (nPCR), Semnested PCR (snPCR) e qPCR têm sido amplamente empregadas para a otimização de novos ensaios diagnósticos, usando diferentes regiões-alvo e amostras biológicas (DA SILVA et al., 2013; GALAI et al., 2011; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009; REIS et al., 2013; VERMA et al., 2013a).

O acompanhamento do tratamento objetivando a avaliação da eficácia de determinada droga é uma abordagem comum (POURABBAS et al., 2013; SUDARSHAN et al., 2011), proporcionada pela qPCR, devido à sua capacidade de estimar a carga parasitária em diversos tipos de espécimes (DE ALMEIDA-FERREIRA et al., 2013; SANTOS-MARQUES et al., 2012). Caracterização de espécies de *Leishmania* é uma importante aplicação da PCR para LV e LT, e é fortemente explorada atualmente (DA SILVA et al., 2010; MOHAMMADIHA et al., 2013b; ROELFSEMA et al., 2011). Usando diferentes metodologias, tais como sequenciamento de gene e análise por *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP), os estudos têm trazido este tipo de análise para fins distintos: confirmação em pesquisas epidemiológicas (MAIA et al., 2010; WANG et al., 2011), obtenção da especificidade de novos ensaios (FRAGA et al., 2010; SRIVASTAVA et al., 2011b) e estudos comparativos (CRUZ et al., 2013). Ozensoy-Toz et al. (2013) usou a temperatura de *melting* (T_m) resultante da qPCR (empregando corantes fluorescentes intercalantes de DNA) como critério de interpretação para a diferenciação de espécies de *Leishmania*, para os agentes etiológicos da LV e LT.

Na qPCR, o produto é analisado durante a amplificação através de coloração com SYBR green ou hibridização com sondas fluorescentes (TaqMan[®] ou FRET *-fluorescence resonance energy transfer*) (ESPY et al., 2006). Neste caso, o ensaio realiza-se em apenas um passo e a detecção da fluorescência é feita em tubo fechado, reduzindo drasticamente o risco de contaminação da reação. Mais rápida em determinar o resultado quando comparada à PCR

convencional, é também uma metodologia de maior praticidade e segurança. Em adição, a utilização de sondas TaqMan[®] duplamente marcadas e dirigidas especificamente para uma região interna da sequência que se deseja amplificar, permite realizar reações de PCR multiplex em tempo real, o que possibilita, por exemplo, a determinação da presença do DNA-alvo e a avaliação da qualidade amostral, em uma mesma reação (RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2013).

Abordagens moleculares inovadoras, como a *Nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA), ou a *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) têm sido cada vez mais aplicadas para a detecção do DNA ou RNA de *Leishmania* (BASIYE et al., 2010; CARSON et al., 2010; DE VRIES et al., 2006; MUGASA et al., 2010). NASBA quantitativa (QT-NASBA) tem sido utilizada para a avaliação da eficácia de drogas para o tratamento da LV, e NASBA oligocromatográfica (NASBA-OC) para o desenvolvimento de ensaios diagnósticos, baseados na detecção de RNA de *L. donovani*. As duas variações possuem diferenças metodológicas importantes: QT-NASBA usa a eletroquimioluminescência como ferramenta de detecção, o que envolve mais etapas e tempo de processamento em relação à qPCR (VAN DER MEIDE et al., 2008). A NASBA-OC usa tiras oligocromatográficas (*dipstick*) para detectar o RNA amplificado, em 5-10 minutos, apenas com uma pipeta e um banho-maria, porém não possui capacidade de quantificação (MUGASA et al., 2010). Apesar das diferenças, ambas têm proporcionado resultados reprodutíveis e sensíveis, e estão sendo indicadas para a determinação de doença ativa. O kit OligoC-TesT baseia-se na detecção simples e rápida do DNA de *Leishmania*, amplificado através de cPCR, usando tiras *dipstick*. Carson et al. (2010), utilizando medula óssea como amostra biológica, demonstrou a sensibilidade do kit para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) (70%), semelhante a da cPCR e superior a da nPCR. Ainda assim, a qPCR obteve a maior sensibilidade dentre as técnicas avaliadas (91%).

LAMP, uma promissora ferramenta diagnóstica, tem sido adotada como uma técnica alternativa à PCR convencional, uma vez que é uma tecnologia mais rápida, sensível e menos onerosa, a qual usa a turbidez da amostra como critério de positividade. Não há necessidade de termociclador, apenas um banho-Maria ou um bloco aquecido, já que a reação é isotérmica (KHAN et al., 2012; NOTOMI et al., 2000; THEKISOE et al., 2009). Como exemplo, Verma et al. (2013b) desenvolveram um ensaio baseado em LAMP para a detecção de *L. donovani* em humanos com LV ou leishmaniose dérmica pós-calazar (*Post-kala-azar dermal leishmaniasis* - PKDL). Sensibilidade e especificidade boas foram alcançadas em ambos os

casos.

Outras variedades como o PFGE – *pulsed field gel electrophoresis* e o MEE – *multilocus enzyme electrophoresis*, também são trabalhadas como métodos diagnósticos moleculares da LV (REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

2.3.1.1 Uso de amostras biológicas alternativas

Dentre as vantagens das técnicas que utilizam DNA como molécula de análise, está a possibilidade da utilização de uma grande variedade de amostras biológicas. A detecção do DNA de *Leishmania* spp. através de qPCR pode ser realizada pela utilização de amostras de sangue, biópsia de medula óssea, aspirado de linfonodos e raspados epiteliais (LOMBARDO et al., 2012). Como exemplos do amplo espectro de possibilidades de utilização amostral, Pandey et al. (2010) e da Silva et al. (2010) padronizaram reações de PCR (snPCR, *L. donovani* e qPCR, *L. infantum*, respectivamente) para a detecção do DNA do parasito em esfregaços corados com Giemsa, preparados a partir de aspirados de medula. Nos dois trabalhos, os ensaios apresentaram-se superiores à microscopia e à cultura.

Devido aos riscos inerentes à obtenção destes espécimes clínicos ao paciente, um crescente interesse na utilização de amostras não invasivas tem surgido (LOMBARDO et al., 2012). Amostras alternativas como urina e *swabs* conjuntivais estão sendo amplamente exploradas para humanos (FISA et al., 2008; GALAÏ et al., 2011; VAISH et al., 2011) e cães (DE ALMEIDA-FERREIRA et al., 2012, 2013; LEITE et al., 2010, 2011; SOLANO-GALLEGO et al., 2007) com boa acurácia.

A urina tem sido empregada por vários pesquisadores para a detecção do DNA de *Leishmania* spp. ou de outros microrganismos, através da PCR convencional (BRINKMAN et al., 2004; FISA et al., 2008;) e da qPCR (SOLANO-GALLEGO et al., 2007), este último para o diagnóstico da LVC. A presença do material genético de *Leishmania* em urina ocorre devido à passagem do DNA livre circulante através da barreira glomerular. Em adição, lesões renais decorrentes da deposição de imunocomplexos, comuns na LV, além da presença do parasito no trato urinário podem elevar a probabilidade de detecção do DNA do parasito nessa amostra (FISA et al., 2008; SALGADO-FILHO et al., 2003). Este espécime clínico, além de ser acessível e de proporcionar comodidade ao indivíduo muitas vezes debilitado, traz maior segurança aos profissionais na sua manipulação, em relação, por exemplo, ao sangue total (DE ALMEIDA-FERREIRA et al., 2013; REIS et al., 2013).

Outros estudos utilizaram as vantagens que a urina proporciona para o desenvolvimento de ensaios diagnósticos com distintas abordagens. Como exemplos, a detecção de antígenos de *Leishmania* sp. através de ELISA ou *Latex agglutination test* (KAtex) para o diagnóstico da LV ativa (ABEIJON; CAMPOS-NETO, 2013; SUNDAR et al., 2005). Ainda, a urina também tem sido explorada para a identificação e avaliação de proteínas produzidas durante a LV ativa, com o intuito de apontar possíveis moléculas candidatas para o desenvolvimento de vacinas (KASHINO et al., 2012).

2.3.1.2 Extração de DNA dos espécimes biológicos

Para que sejam analisadas através de ferramentas diagnósticas moleculares, amostras clínicas de qualquer natureza precisam ser submetidas a um procedimento de extração de DNA, de acordo com as suas diferentes propriedades e composições. A eficiência da etapa de extração pode ser crítica para a amplificação bem sucedida, uma vez que existem muitos componentes que inibem a reação de PCR e que podem ser co-purificados com o DNA (ANKLAM et al., 2002). Os kits comerciais normalmente garantem a remoção de inibidores que comumente estão presentes nos espécimes a que seus protocolos são direcionados. Entretanto, a eficiência da remoção pode variar, de acordo com o kit. Métodos *in house* também são desenvolvidos com esse propósito, ao mesmo tempo em que objetivam um isolamento de DNA em razoáveis quantidades com pureza, integridade, e com baixo custo (DA SILVA et al., 2014).

A extração de ácido nucléico é frequentemente a etapa mais prolongada do método de PCR (ANKLAM et al., 2002). Como o tempo é um fator limitante para o estabelecimento de um ensaio diagnóstico no sistema público de saúde, é importante que esse item também seja levado em consideração, tanto quanto os fatores eficiência e custo, para a escolha do melhor procedimento. O uso de um protocolo laborioso também está sujeito à inviabilidade.

Uma extração de qualidade pode permitir diversas aplicações ao ácido nucléico isolado, e que vão além dos ensaios de PCR, como a digestão com enzimas de restrição (caracterização de espécies) e hibridizações em membrana (*Southern* e *dot/slot blots*) (PROMEGA, 2012; QIAGEN, 2003).

Ainda são escassos os trabalhos que utilizaram a urina para a detecção do material genético de *Leishmania* spp., principalmente quando comparado ao uso de outros espécimes. Fisa et al. (2008), Manna et al. (2008), Franceschi et al. (2007) e Solano-Gallego et al. (2007)

são alguns dos poucos exemplos; apenas o primeiro foi direcionado para humanos. Apesar disso, os protocolos de extração empregados são bastante divergentes, e de forma geral não são direcionados para esse tipo de amostra. Por esses motivos, diferentes métodos de extração de DNA precisam ser testados e analisados, previamente à escolha do protocolo a ser incorporado ao ensaio diagnóstico.

2.3.1.3 Controles de qualidade amostral

A despeito de suas vantagens e do avanço tecnológico, a PCR ainda possui certas deficiências que precisam ser levadas em consideração para o desenvolvimento de um ensaio diagnóstico confiável. A faixa de concentração detectável limitada em alguns ensaios é um importante fator. Outro ponto é o fato de muitos inibidores da enzima *Taq* Polimerase serem encontrados nos mais variados espécimes biológicos, ou serem comumente usados para a coleta e extração de amostras, como EDTA, Proteinase K, Fenol e altas concentrações de sais (GONÇALVES et al., 2012; YANG-ROTHMAN et al., 2004).

Controles de qualidade amostral, baseados na amplificação de genes constitutivos do hospedeiro, *housekeeping genes*, têm sido utilizados não apenas para a garantia dos resultados negativos, mas também para a normalização de concentrações iniciais de DNA, para a verificação da integridade da amostra e para determinação da eficácia do procedimento de extração (ANDREADOU et al., 2012; DE ALMEIDA-FERREIRA et al., 2012, 2013; MANNA et al., 2008; NARANJO et al., 2012; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009; QUARESMA et al., 2009; SANTOS-MARQUES et al., 2012; SUDARSHAN et al., 2011).

Como exemplos, os genes Gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase (G3PD ou GAPDH), β -actina, citocromo c e 18S RNA são frequentemente escolhidos como alvos para humanos e/ou cães (ANDREADOU et al., 2012; NARANJO et al., 2012; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009; SANTOS-MARQUES et al., 2012). A expressão destes genes em todas as células de mamíferos garante a sua detecção em amostras com condições apropriadas para o teste diagnóstico (CASTILHO et al., 2008; GILSBACH et al., 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2007). Chaouch et al. (2013) desenvolveram uma reação para detecção de *L. infantum* em cães por LAMP, e a sensibilidade alcançada foi baixa (54,2%). Este resultado pode ser explicado em parte pelo alvo de amplificação escolhido, mas também pelo não uso de um controle de qualidade para a avaliação amostral.

Recentemente, alguns autores têm trazido a estratégia da multiplex PCR para o

diagnóstico mais seguro da LV. Eles têm incluído o controle de qualidade em conjunto com o sistema de detecção de *Leishmania* spp., na mesma reação, para ensaios de cPCR (GONÇALVES et al., 2012; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2014a; 2014b) e qPCR (LOMBARDO et al., 2012). Esta estratégia traz benefícios em termos de economia de tempo, redução de custos e de laboriosidade. Gonçalves et al. (2012) demonstraram, através da utilização do controle endógeno, qualidade insatisfatória em 33% das amostras testadas (potenciais resultados falso-negativos), deixando clara a importância do uso do mesmo na PCR.

2.3.1.4 Alvos moleculares

A seleção da região-alvo no genoma do agente etiológico é uma das mais importantes decisões a serem tomadas quando se propõe um novo protocolo diagnóstico molecular. Vários alvos diferentes são usados para a detecção de *Leishmania* sp.: *Internal transcribed spacer-1* (ITS-1), RNA *small subunit gene* (SSU rRNA), mini-exon, dentre outros. Esse é um dos desafios a serem vencidos para a futura implementação de um protocolo molecular padrão-ouro para a LV. Muitos alvos são usados com sucesso ou com relativo sucesso, ocorrendo uma falta de consenso entre os estudos.

O DNA mitocondrial (ou cinetoplasto-kDNA) é amplamente eleito para a amplificação do Complexo *L. donovani*, devido ao grande número de cópias dos chamados minicírculos (~ 10.000 por parasito), em seu interior (RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990). Esse alvo tem sido escolhido para diversas aplicações, tais como estudos epidemiológicos em populações caninas, em países como Brasil e China (BIGELI; JUNIOR; TELES, 2012; SHANG et al., 2011; WANG et al., 2011), para caracterização de espécies (CRUZ et al., 2013; WANG et al., 2011), para acompanhamento de tratamento (SUDARSHAN et al., 2011) e para o desenvolvimento de novos ensaios, com ótimos resultados (VERMA et al., 2013a, 2013b).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar estratégias para o aprimoramento do diagnóstico molecular da leishmaniose visceral, baseadas na detecção de região-alvo do kDNA de *L. infantum*.

3.2 Específicos

- a) Otimizar um sistema de qPCR para a detecção de *L. infantum* em amostras de urina;
- b) Avaliar diferentes métodos de extração de DNA para amostras de urina;
- c) Determinar a eficiência da reação para o sistema LINF 1B em detectar o kDNA de *L. infantum* em amostras de urina;
- d) Desenhar sondas TaqMan[®] para a detecção de *L. infantum* e do controle interno da qualidade amostral (gene G3PD de mamíferos);
- e) Otimizar um sistema duplex qPCR para a detecção simultânea de *L. infantum* e do controle interno da qualidade amostral (gene G3PD) em amostras de sangue;
- f) Avaliar as novas estratégias desenvolvidas (qPCR em urina e duplex qPCR em sangue), comparando-as com as técnicas clássicas para o diagnóstico das leishmanioses;
- g) Avaliar as novas estratégias desenvolvidas, comparando-as com as técnicas clássicas para o diagnóstico das leishmanioses, a partir de amostras provenientes de pacientes portadores do HIV.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo de avaliação de métodos diagnósticos, baseado em etapas sugeridas por Sackett e Haynes (2002), consistindo em três fases: I – Análise da reprodutibilidade dos testes em amostras sabidamente positivas e negativas; II – Análise da sensibilidade e especificidade analítica dos novos testes; III – Análise estatística da concordância dos resultados dos novos testes com resultados de testes consagrados pela literatura em amostras de campo.

4.2 Amostragem

4.2.1 Obtenção das amostras

As amostras foram obtidas por Conveniência (COSTA NETO, 1977; REIS, 2003).

Para as etapas iniciais do estudo (otimização e fase I) foram utilizadas amostras de urina e sangue de indivíduos residentes em áreas não endêmicas para as leishmanioses, que não receberam transfusão sanguínea e apresentaram diagnóstico molecular e sorológico negativos, sendo estes definidos como controles negativos.

Para as fases II e III foram obtidas amostras de urina e sangue de pacientes provenientes de áreas endêmicas, de acordo com o número de pacientes com suspeita clínica de LV, procedentes dos Hospitais de Referência (Hospital Universitário Oswaldo Cruz – HUOC, Hospital Barão de Lucena – HBL, Hospital das Clínicas – HC/PE e Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP) que aceitaram participar da pesquisa, as quais compuseram o Grupo 01.

No Grupo 02 (fases II e III) foram incluídos pacientes com HIV/AIDS, previamente diagnosticados de acordo com o fluxograma preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2013), atendidos no HC/PE e no Hospital Correia Picanço, provenientes ou não de áreas endêmicas para a LV.

4.2.2 Diagnóstico de pacientes através do conjunto de critérios

Dentre os indivíduos que compuseram o grupo de saudáveis, foram considerados controles, aqueles que nunca habitaram em área endêmica, não receberam transfusão sanguínea e apresentaram diagnóstico molecular (cPCR e qPCR) negativo pelo Serviço de Referência em Leishmaniose (SRL) FIOCRUZ/PE, de acordo com Paiva-Cavalcanti et al. (2013; 2009), bem como teste sorológico (ELISA - rK39 - ICT) negativo. Foram considerados positivos para LV, pacientes dos Grupos 01 e 02 com sinais clínicos, histórico epidemiológico compatível e que apresentaram positividade para algum dos três testes laboratoriais de referência (microscopia de punção de medula óssea, ELISA - rK39 – ICT ou qPCR em sangue).

4.3 Diagnóstico laboratorial

4.3.1 Diagnóstico parasitológico

A pesquisa de *Leishmania* foi realizada em aspirado de medula óssea de pacientes do Grupo 01. A coleta do material foi feita por médicos treinados dos respectivos hospitais de Referência participantes da pesquisa. Do material obtido foram confeccionados esfregaços em seis lâminas, examinadas em microscópio óptico para pesquisa das formas amastigotas (BRASIL, 2014a).

4.3.2 Diagnóstico sorológico

A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* em sangue foi realizada utilizando o teste imunocromatográfico que tem como antígeno a proteína recombinante K39 (InBios, Seattle, WA, USA), conforme as recomendações do fabricante.

4.3.3 Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular foi realizado utilizando o sistema LINF 1B, que detecta um fragmento de 132 pares de bases do kDNA do Complexo *L. donovani* (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009).

4.4 Coletas de amostras biológicas

4.4.1 Urina

As amostras de urina foram obtidas em volume de aproximadamente 50 ml, por micção espontânea em frasco estéril contendo 50 µL de solução de EDTA a 10 mM. As amostras foram preservadas sob refrigeração entre 4-8°C, para posterior divisão em alíquotas e armazenamento a -80°C.

4.4.2 Sangue

Para todos os indivíduos que se obtiveram amostras de urina, o sangue também foi coletado. Após antissepsia com algodão embebido em álcool etílico 70%, e com auxílio de uma seringa acoplada a uma agulha 25x7 mm, foram coletados 10 ml de sangue, sendo 5 ml em tubo com EDTA (0,009 g/5 ml de sangue), para posterior extração de DNA, e 5 ml em tubo seco para obtenção do soro utilizado na pesquisa de anticorpos.

4.5 Processamentos das amostras

As amostras foram processadas no Laboratório de Doenças Transmissíveis do departamento de Parasitologia e Laboratório de Imunoparasitologia do departamento de Imunologia, bem como no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM-FIOCRUZ/PE.

4.5.1 Construção das curvas de diluição

Amostras de urina provenientes de indivíduos sabidamente negativos (saudáveis) foram subdivididas em volumes idênticos (para uma mesma amostra), entre 200 e 5.000 µL. Às alíquotas, foi adicionado DNA genômico de *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75), em concentrações decrescentes, a fim de obter curvas de diluição, com 5×10^3 a 5×10^{-3} fg do material genético ($3,5 \times 10^1$ a $3,5 \times 10^{-5}$ parasitos) por µL de urina para a otimização do sistema, bem como para avaliação dos diferentes métodos de extração de DNA na referida amostra.

Da mesma forma, amostras de sangue de indivíduos sabidamente negativos foram subdivididas em volumes idênticos (200 µL) para a construção de curvas de diluição, pela adição de concentrações decrescentes (2×10^5 a 2×10^{-2} fg por µL de amostra) do DNA

genômico de *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75), a fim de otimizar o sistema duplex.

As medições das concentrações de DNA foram realizadas com o Nanodrop[®] 2000c (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts).

4.5.2 Extração de DNA em urina

Foram avaliados os seguintes protocolos: Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, USA) modificado, QIAamp[®] DNA Mini Kit, QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN Sample and Assay Technologies) seguindo as recomendações do fabricante, e Fenol-clorofórmio modificado (*in house*) (DA SILVA et al., 2014).

4.5.3 Extração de DNA em sangue

A extração de DNA das amostras de sangue foi efetuada com o QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Sample and Assay Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.6 Otimização da qPCR em urina

Foi realizado um experimento inicial em condições determinadas por Paiva-Cavalcanti et al. (2009), para a avaliação da performance do sistema LINF 1B em amostras de urina. Este experimento foi composto por amostras contendo DNA genômico de *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) nas quantidades de 1×10^5 fg, 1×10^4 fg e 1×10^3 fg, e controles negativos. O DNA padrão foi adicionado em amostras de urina provenientes de indivíduos controles (item 4.2.1). O volume final da reação foi de 50 μ l, sendo 25 μ l de *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems[®], CA, USA) e 2 μ l das amostras extraídas contendo DNA genômico de *L. infantum*. A reação continha 3 pmoles de cada *primer*. Todas as amostras foram produzidas em duplicata. A reação foi efetuada com 40 ciclos.

Após a análise dos resultados do experimento preliminar, para que o sistema alcançasse a máxima eficiência em amostras de urina, foi avaliada a necessidade de modificações nas concentrações dos reagentes, assim como nas condições de ciclagem (temperaturas de anelamento e extensão).

Após a otimização, diferentes métodos de extração (item 4.5.2) foram avaliados, considerando-se as distintas capacidades dos mesmos em recuperar determinadas quantidades de DNA do agente etiológico presente na urina (limite de detecção). Para tanto, utilizou-se as curvas de diluição descritas no item 4.5.1. As amostras foram produzidas em duplicata.

Após a análise dos limites de detecção alcançados pelo sistema LINF 1B, utilizando como *template* as curvas resultantes de cada procedimento de extração, e posteriormente à análise de outras propriedades, tais como adequabilidade ao tipo de amostra, laboriosidade/tempo de processamento e custo, um método de extração foi eleito para ser incorporado ao ensaio.

Depois da escolha do melhor método de extração, a eficiência da reação foi determinada de acordo com Too (2003), por meio da fórmula: $\varepsilon = (10^{1/\text{slope}}) - 1$. A necessidade de novas modificações nas condições da reação foi analisada.

Em todos os experimentos, foram incluídos controles negativos (amostras sem DNA e DNA obtido de indivíduos saudáveis), bem como controle de qualidade amostral (sistema G3PD1) em reações separadas (GONÇALVES et al., 2012).

4.7 Análise de reprodutibilidade e documentação dos resultados

Para a avaliação da reprodutibilidade, análises intra e inter-ensaio foram efetuadas. Para tanto, após a otimização, as amostras sabidamente positivas e negativas (conforme item 4.2.2) utilizadas nos experimentos preliminares foram processadas em duplicata utilizando o protocolo de extração escolhido, tendo sido, o mesmo experimento, repetido três vezes.

Os experimentos foram efetuados com o aparelho ABI Prism 7500 (Applied Biosystems[®], CA, USA). A análise, interpretação e registro dos resultados foram efetuados com o auxílio do *software* ABI PRISM 7500 SDS (versão 1.4).

4.8 Desenvolvimento da duplex qPCR

O sistema duplex qPCR foi desenvolvido com base na combinação dos sistemas LINF 1B (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009) e G3PD1 (GONÇALVES et al., 2012), para detecção simultânea do kDNA de *L. infantum* e do gene G3PD de mamíferos, respectivamente.

4.8.1 Desenho das sondas TaqMan[®]

Com o auxílio do *software* PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/scitooes>), sondas compatíveis com o sistema LINF 1B (sonda A) e com o sistema G3PD1 (sonda B) foram desenhadas.

A escolha das sondas para composição do sistema de duplex qPCR baseou-se na temperatura de *melting* (T_m), tamanho (em número de bases), e percentual de guaninas e citosinas. As sondas escolhidas foram sintetizadas com a tecnologia *TaqMan probe* (Applied Biosystems[®]). A especificidade das sondas foi preliminarmente avaliada *in silico* por alinhamento múltiplo das sequências, utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.8.2 Otimização individual dos sistemas LINF 1B e G3PD1 com as respectivas sondas

Inicialmente, foram realizados experimentos preliminares para testar e avaliar as concentrações ótimas de *primers* e sonda de ambos os sistemas, em uniplex qPCR.

Primeiramente, concentrações entre 1 e 5 pmol/ μ L dos *primers* Linf 1 23F (*forward*); Linf 1 154R (*reverse*) (LINF 1B) e G1F (*forward*); G1R (*reverse*) (G3PD1) foram testadas utilizando as respectivas sondas (A ou B) em uma concentração de 2,5 pmol/ μ L. Uma quantidade padrão de 1×10^6 fg de DNA de *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75), ou DNA extraído de um volume de 200 μ L de sangue total (Grupo controle) foi adicionado às respectivas reações. Volume final (ambas as reações): 50 μ L, sendo 25 μ L de *TaqMan[®] Universal Master Mix* (Applied Biosystems[®], CA, USA), e 5 μ L de *template*; todas as amostras foram produzidas em duplicata. As condições de ciclagem foram as padronizadas para o sistema LINF 1B, por Paiva-Cavalcanti et al. (2009); 95°C/15 segundos e 60°C/1 minuto, em 40 ciclos. As menores concentrações dos *primers* a gerar um mínimo C_t (Ciclo *threshold*) e um máximo ΔR_n (*normalized reporter*) foram as escolhidas como ótimas.

Em seguida, concentrações entre 0,5 e 2,5 pmol/ μ L das sondas A e B foram testadas, utilizando a concentração ótima dos *primers* de LINF 1B e G3PD1 obtida no primeiro experimento. As mesmas condições de reação e ciclagem da etapa anterior, bem como a quantidade do DNA padrão foram utilizadas. As menores concentrações das sondas a gerar um mínimo C_t foram as escolhidas como ótimas.

4.8.3 Otimização dos sistemas LINF 1B e G3PD1 em conjunto

O conjunto formado pelo sistema de *primers* escolhido para detecção do agente etiológico (*primers* LINF1B) e sua respectiva sonda A foi combinado com o sistema G3PD1 mais sonda B, formando assim a duplex qPCR.

O teste preliminar da nova duplex ocorreu segundo as condições de ciclagem padronizadas para a reação de qPCR para o sistema LINF 1B. As concentrações dos *primers* e das sondas foram as definidas nas etapas prévias (item 4.8.2), entretanto precisaram ser ajustadas (de acordo com Applied Biosystems[®], 2001a) para que fossem adicionadas as mesmas quantidades por reação duplex. Uma curva preparada a partir da adição do DNA de *L. chagasi* em 200 µL de sangue (como descrito no item 4.5.3, Grupo controle) foi utilizada. O *master mix* foi elaborado com adição de 25 µL de *TaqMan[®] Universal Master Mix* (Applied Biosystems[®]) e 5 µL do *template*. Volume final: 50 µL.

Para a otimização do limite de detecção da duplex qPCR, foi realizado o procedimento chamado *Matriz de Limitação de Primer*, de acordo com o protocolo descrito em ABI Prism[®] 7700 *Sequence Detection System – User Bulletin #5* (Applied Biosystems[®], 2001b).

Em todos os experimentos de ambas as etapas de otimização (individual e em conjunto) da duplex qPCR foram incluídas amostras sem DNA e DNA obtido de indivíduos saudáveis (controles negativos).

Análise de reprodutibilidade e documentação dos resultados foram efetuadas conforme descrito no item 4.7.

4.9 Avaliação das ferramentas diagnósticas

As amostras de urina e sangue (dos Grupos 01 e 02) foram analisadas por qPCR e pelo ensaio duplex qPCR, respectivamente. Para a qPCR em urina, os resultados obtidos foram comparados com os resultados fornecidos pelo conjunto de critérios, conforme o item 4.2.2. Já os resultados da duplex qPCR foram comparados com os obtidos pelo protocolo de qPCR em sangue (item 4.3.3).

As análises de concordância entre os novos testes e as técnicas de referência foram realizadas por meio de estatística descritiva, com distribuições absolutas e percentuais; os dados foram comparados usando Qui Quadrado de Independência, ou o Teste Exato de Fisher,

ao nível de 5% e 1% de significância, respectivamente. Todas as análises foram efetuadas com o auxílio do software BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os pacientes e/ou seus responsáveis, bem como os indivíduos saudáveis foram convidados a assinarem os termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndices A, B, C e D), autorizando a utilização do material coletado para fins científicos.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do CPqAM/FIOCRUZ-PE, parecer 345.369 (Anexo A) registro no CAAE: 13422213.3.0000.5190, em consonância com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

As etapas do projeto referentes ao desenvolvimento da qPCR duplex foram previamente aprovadas pelo CEP/CPqAM/FIOCRUZ-PE, parecer 42/2010 (Anexos B e C) registro no CAAE: 0041.0.095.000-10.

6 RESULTADOS

6.1 Amostragem

Amostras de 18 indivíduos de diferentes idades e sexos, residentes em áreas endêmicas e com características clínicas de LV foram coletadas. De acordo com o conjunto de critérios pré-estabelecidos (item 4.2.2), 10 pacientes (55,55%) foram considerados positivos, e 08 negativos. Antes da obtenção dos espécimes clínicos, 05 pacientes já haviam recebido uma ou mais doses (entre 10 e 20 mg/Sb⁺⁵/Kg/dia) do antimonio de N-metilglucamina (Glucantime[®]). Valores séricos de ureia (U: 10-40 mg/dl) e creatinina (C: 0,60-1,30 mg/dl) apresentaram-se elevados em 01 paciente (Tabela 1).

Tabela 1 – Pacientes com suspeita clínica de leishmaniose visceral (Grupo 01) definidos como positivos ou negativos para a LV, e o número de doses do Glucantime[®] recebidas pré-coleta de material biológico, bem como presença ou ausência de alteração dos níveis de marcadores séricos de função renal, ureia e creatinina.

Paciente/carga parasitária (fg)/mielograma	Número de doses (Glucantime)[®] (entre 10 e 20 mg/ Sb⁺⁵/Kg/dia)	Níveis alterados de ureia e creatinina? (U: 10-40 mg/dl C: 0,60-1,30 mg/dl)
P1 + (133,5)/ M+	2	Não
P2 + (*)/ M+	2	Não
P3 + (65,09)	0	Sim
P4 + (33,52)/ M-	1	Não
P5 + (5.179,5)/ M+	1	Não
P6 + (*)/ M+	18	Não
P7 + (201,55)	0	Não
P8 + (1.867,9)	0	Não
P9 + (4,52)	0	Não
P10 + (3,27)	0	Não
P11 -	–	Não
P12 -	–	Não
P13 -	–	Não
P14 -	–	Não
P15 -	–	Não
P16 -	–	Não
P17 -	–	Não
P18 -	–	Não

Fonte: elaborado pelo autor.

Nota: P: paciente Grupo 02; (+): paciente positivo; (-): paciente negativo, de acordo com os critérios pré-estabelecidos no item 4.2.2 (*): negativo para qPCR em sangue.

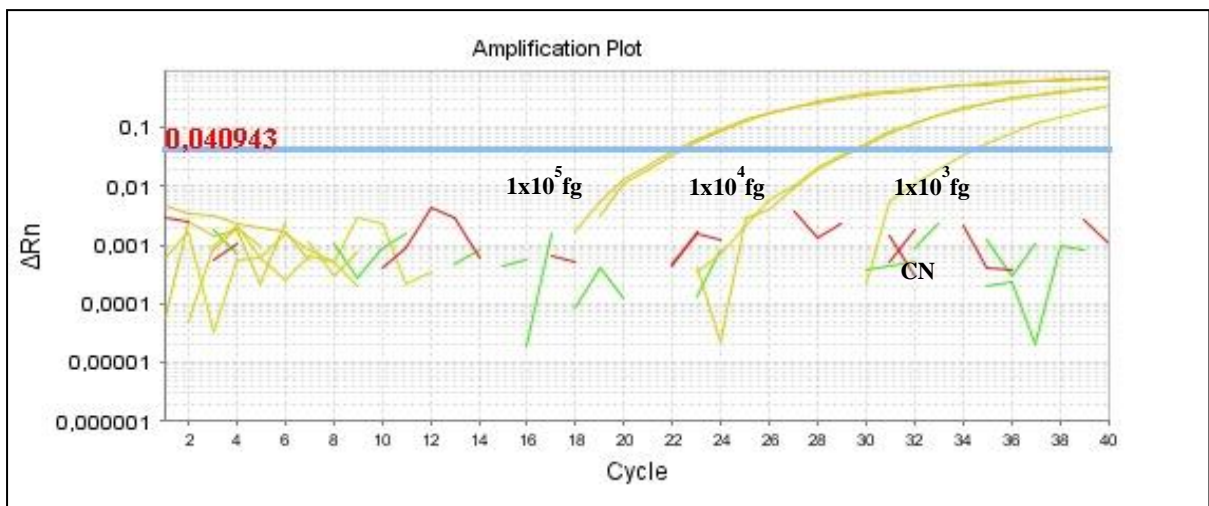
Legenda: M: positivo/ negativo para mielograma.

Em relação aos pacientes HIV/AIDS positivos (Grupo 02), foram obtidas 50 amostras, classificadas a seguir: 06 (12%) foram consideradas positivas (coinfecção), com cargas parasitárias variando de 6,29 a 412,29 fg, e 44 negativas. Do total (n= 50), 07 apresentaram níveis alterados de U e C, dos quais 01 apresentou-se como positivo. Nenhum paciente do Grupo 02 recebeu qualquer medicamento específico anti-*Leishmania* até a realização da coleta dos espécimes clínicos.

6.2 Otimização da qPCR em urina

O teste preliminar do sistema LINF 1B em amostras de urina mostrou que o DNA de *L. infantum* foi amplificado nas três quantidades testadas (1×10^5 , 1×10^4 e 1×10^3 fg), com uma boa eficiência analítica (80,72%), demonstrando assim o funcionamento do sistema para o espécime utilizado (Figura 3), não sendo portanto necessárias alterações nas condições de ciclagem e concentração dos reagentes.

Figura 3 – Teste preliminar da qPCR utilizando DNA de *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP 75) adicionado em urina, extraída por kit comercial.



Fonte: elaborado pelo autor. Legenda: CN: controles negativos; Rn: *normalized reporter*.

Nota: As quantidades de DNA indicadas são por reação de 50 μ L. O sistema LINF 1B amplificou o material genético do parasito em três diferentes concentrações.

Após a análise do teste preliminar, a extração do DNA do parasito (em curvas de diluição) foi realizada por diferentes métodos de extração, e distintos limites de detecção pelo sistema LINF 1B foram alcançados (Quadro 1).

A análise das diferentes características associadas aos procedimentos de extração de DNA gerou o seguinte quadro comparativo (Quadro 1):

Quadro 1 – Características dos procedimentos de extração de DNA empregados em urina, para o diagnóstico da leishmaniose visceral por PCR quantitativa em tempo real.

Procedimento de extração de DNA (I – IV)	Laboriosidade/tempo de processamento (01 amostra)	Custo R\$ (01 amostra)	Limite de detecção (por μL de amostra)	Volume utilizado (μL)	Volume de eluição
I – Wizard® Genomic DNA Purification kit (modificado)	Média/ 2 horas, 30 min.	3,21	5×10^1 fg	300 μL	100 μL
II – Fenol-clorofórmio modificado (<i>in house</i>)	Alta/ 2 horas, 30 min.	3,50	5×10^{-1} fg	5000 μL	20 μL
III – QIAamp® DNA mini kit	Baixa/1 hora	4,28	5 fg	200 μL	200 μL
IV – QIAamp® Viral RNA mini kit	Baixa/ 1 hora	19,12	5 fg	200 μL	60 μL

Fonte: elaborado pelo autor.

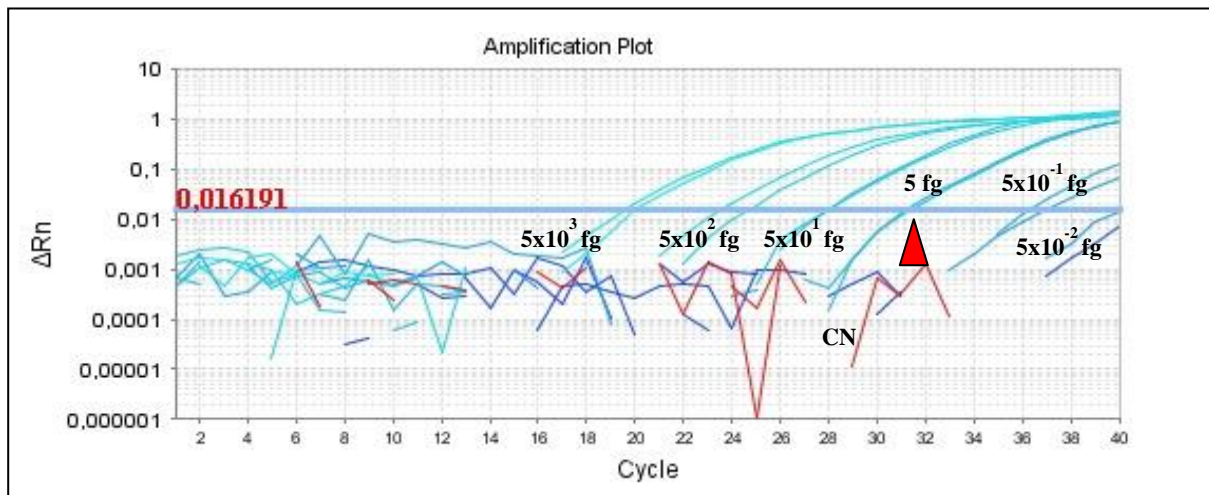
Em um dos kits (I) houve uma modificação para a otimização de seu rendimento. Na primeira etapa do protocolo, 600 μL de etanol gelado (99.5%) foram adicionados a 300 μL das amostras da curva (razão 2:1), que foram então centrifugadas a 15.700 x g, por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* resultantes foram agitados em vortex durante 1 minuto. Essa modificação substitui apenas a etapa chamada *Red Blood Cell Lysis*, e tem por princípio a precipitação de sólidos suspensos, incluindo as moléculas de DNA por substância etílica. A execução do protocolo não modificado resulta em perda significativa de material genético, e conseqüentemente, um menor rendimento é obtido.

A amplificação do controle de qualidade amostral (gene G3PD) ocorreu em todos os experimentos.

Com base nos limites de detecção obtidos pelo sistema LINF 1B, e nas diferentes propriedades dos protocolos analisados, o método III foi o escolhido para ser incorporado ao ensaio de qPCR em urina.

A análise de reprodutibilidade indicou manutenção do limite de detecção (5 fg do DNA de *L. chagasi* por μL de urina; $\sim 0,034$ parasitos), utilizando o procedimento III como método de extração, e com uma eficiência analítica (ϵ) = 93,59%. C_t da amostra (5 fg) = 31,54 (Figuras 4 e 5).

Figura 4 – Análise de reprodutibilidade referente à qPCR em urina.

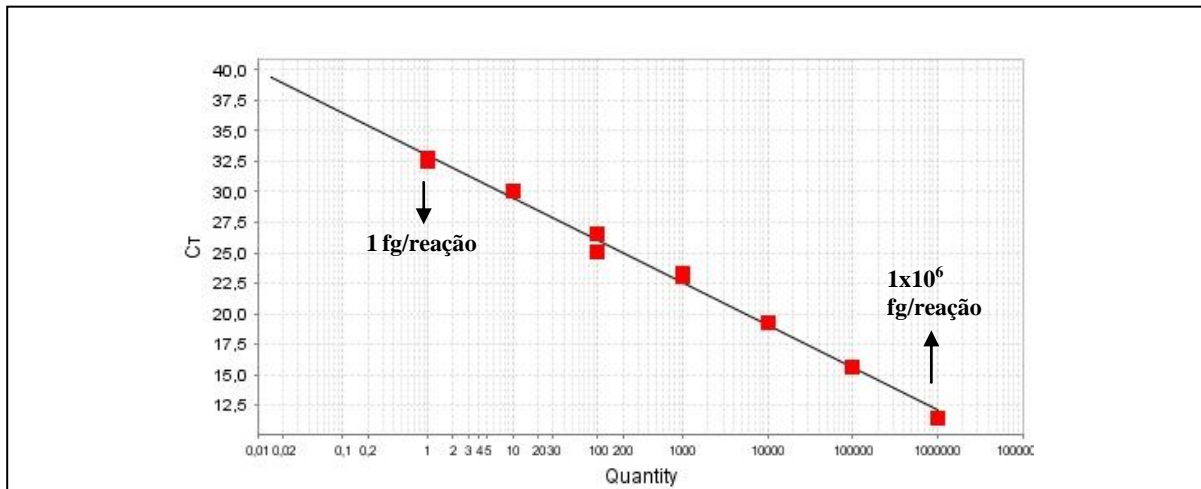


Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: CN: controles negativos; Rn: *normalized reporter*.

Nota: O limite de detecção do sistema LINF 1B foi determinado por meio de diluições seriadas (fator 10) de DNA genômico de *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP 75), nas concentrações de 5×10^{-3} a 5×10^3 fg/ μL de urina, após a extração pelo protocolo III. O limite alcançado, indicado na seta vermelha, foi reprodutível (5 fg/ μL), com *Ciclo threshold* (C_t) = 31,54.

Figura 5 – Curva-padrão de *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP 75), resultante do experimento de reprodutibilidade do ensaio qPCR em urina.



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: C_t : ciclo *threshold*.

Nota: Quantidades entre 1fg e 1×10^6 fg de DNA por reação (50 μ L) foram utilizadas. A eficiência analítica da reação (ϵ) = 93,59%. Slope: -3,683; coeficiente de determinação (R^2): 0,977.

Visto o valor da eficiência (ϵ) alcançado pela reação, bem como o limite de detecção obtido, optou-se por manter as condições de reação e ciclagem iniciais. Portanto, o novo ensaio foi considerado otimizado. O Quadro 2 traz a composição do *master mix*: os volumes e as concentrações dos reagentes, bem como as condições de ciclagem do ensaio.

Quadro 2 – Composição final do *master mix* e condições de ciclagem do ensaio de qPCR em amostras de urina.

Componentes	Volume/Tubo (μ L)	Concentração final
Água livre de DNase	21,0	–
SYBR Green PCR Master Mix (2X)	25,0	1X
LINF 1 23F	1,0	3 pmol/ μ L
LINF 1 154R	1,0	3 pmol/ μ L
DNA (<i>Template</i>)	2,0	
Total:	50,0	
Ciclagem: 95°C/15 s; 60°C /1min.; 40 ciclos		

Fonte: o autor.

Legenda: F: *primer forward*; R: *primer reverse*.

6.3 Desenvolvimento da duplex qPCR

6.3.1 Desenho das sondas TaqMan[®]

As sondas estão apresentadas no Quadro 3.

A partir da análise *in silico* de especificidade da sonda A pelo BLASTn, foi observada uma identidade de 100% (*E value*: 3e-12; *Query cover*: 100%) com a sequência do kDNA de *L. infantum* (número de acesso: AJ270144).

A análise de especificidade da sonda B com o gene G3PD de mamíferos está apresentada no Quadro 4.

Quadro 3 – Características das sondas TaqMan® A e B, desenhadas para o sistema LINF1 B e G3PD1, para composição de ensaios duplex qPCR, respectivamente.

Sistema/sonda	Sequência	Corante fluorescente	T _m (°C)	GC%	Tamanho (n° de bases)
LINF 1B sonda A	5'- AAATGGGTGCAGAAA	FAM™	59,4	42,3	26
	TCCCGTTCAAA-3'				
G3PD1 sonda B	5'- ATCACTGCCACCCAGA	VIC®	68,0	54	24
	AGACTGTC-3'				

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: GC%: percentagem de Guanina e Citosina; T_m: temperatura de *melting*.

Quadro 4 – Análise de especificidade entre a sonda B e o gene G3PD de mamíferos.

Espécie	<i>Query cover</i>	<i>E value</i>	Identidade	Número de acesso (NCBI)
<i>Homo sapiens</i>	95%	1e-10	100%	NG_007073
<i>Macaca fascicularis</i>	95%	3e-10	100%	XM_005569913
<i>Mus musculus</i>	95%	3e-10	100%	NM_001289726
<i>Canis familiaris</i>	83%	1e-08	100%	NM_001003142
<i>Felis catus</i>	83%	3e-06	95%	NM_001009307

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: NCBI: *National Center for Biotechnology Information*.

Não foi encontrada similaridade significativa entre a sonda A e a sequência do gene G3PD, bem como entre a sonda B e a sequência do kDNA de *L. infantum*.

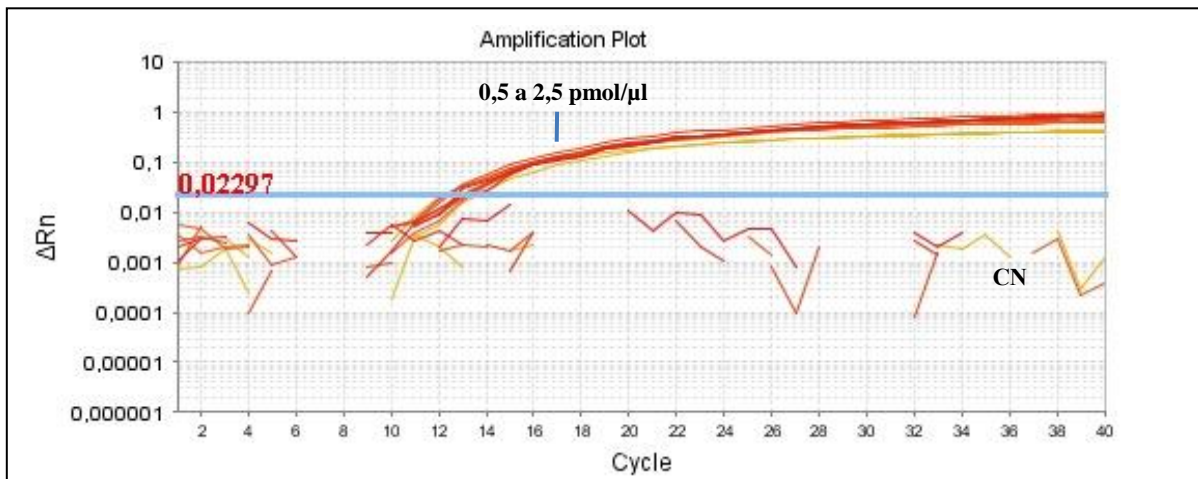
6.3.2 Otimização individual dos sistemas LINF 1B e G3PD1 com as respectivas sondas

A partir da análise dos valores mínimos e máximos de C_t e ΔR_n gerados nos ensaios de otimização individual, as seguintes concentrações de *primers* e sondas foram escolhidas: para

o sistema LINF 1B, 2 pmol/ μL de cada *primer*, e 1,5 pmol/ μL da sonda A ($C_t = 13,04$). Para o sistema G3PD1, 3 pmol/ μL de cada *primer*, e 0,5 pmol/ μL da sonda B ($C_t = 30,88$).

As Figuras 6 e 7 trazem os gráficos de amplificação do kDNA de *L. chagasi* e do gene G3PD (respectivamente), com concentrações variáveis das sondas A e B, e com os *primers* em suas concentrações já definidas.

Figura 6 – Amplificação do DNA genômico de *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) pelo sistema de *primers* LINF 1B a 2 pmol/ μL , utilizando a sonda A entre as concentrações de 0,5 e 2,5 pmol/ μL .

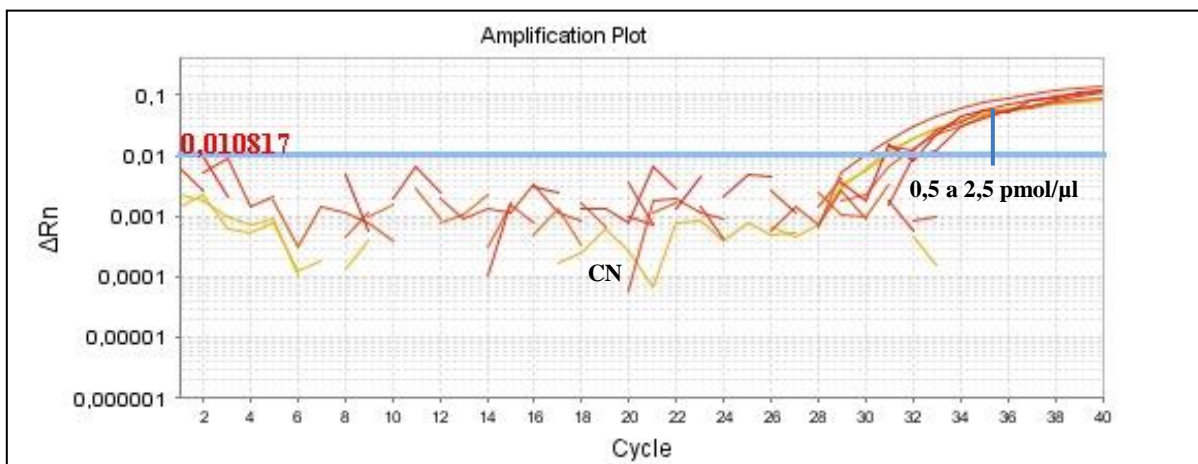


Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: CN: controles negativos. Rn: *normalized reporter*.

Nota: Quantidade de DNA por reação: 1×10^6 fg. A partir da análise dos valores mínimos do C_t (ciclo *threshold*), a concentração da sonda escolhida como ótima foi a de 1,5 pmol/ μL .

Figura 7 – Amplificação do DNA genômico de *H. sapiens* pelo sistema de *primers* G3PD1, a 3 pmol/ μL , utilizando a sonda B entre as concentrações de 0,5 e 2,5 pmol/ μL .



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: CN: controles negativos. Rn: *normalized reporter*.

Nota: Volume padrão de sangue extraído (01 amostra): 200 μL . A partir da análise dos valores mínimos do C_t (ciclo *threshold*), a concentração da sonda escolhida como ótima foi a de 0,5 pmol/ μL .

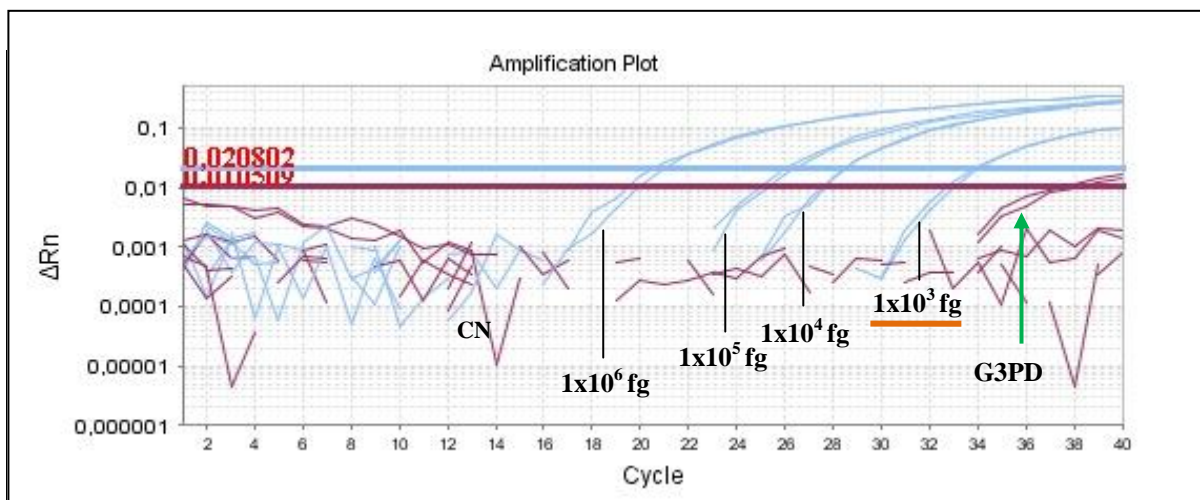
6.3.3 Otimização dos sistemas LINF 1B e G3PD1 em conjunto

Utilizando as quantidades (por reação) dos *primers* e das sondas definidas na etapa anterior de otimização, os sistemas LINF 1B e G3PD1 foram combinados para o experimento preliminar da duplex qPCR em sangue, obtendo-se um limite de detecção preliminar de 1×10^3 fg do DNA de *L. chagasi* por reação (50 μ L), equivalente a aproximadamente 2×10^2 fg ($\sim 1,4$ parasito) do material genético por μ L de sangue. A amplificação simultânea dos dois alvos ocorreu a partir da concentração de 2×10^3 fg/ μ L de amostra.

Mesmo após a realização da matriz de limitação dos *primers*, e após modificações nas condições de reação e ciclagem, o limite de detecção da duplex qPCR manteve-se.

A análise de reprodutibilidade da duplex qPCR indicou manutenção do limite de detecção, bem como da concentração a partir da qual ocorre amplificação simultânea de ambos os alvos. Eficiência analítica (ϵ) = 93,85%. C_t da amostra (2×10^2 fg) = 33,84 (Figuras 8 e 9).

Figura 8 – Análise de reprodutibilidade da duplex qPCR.

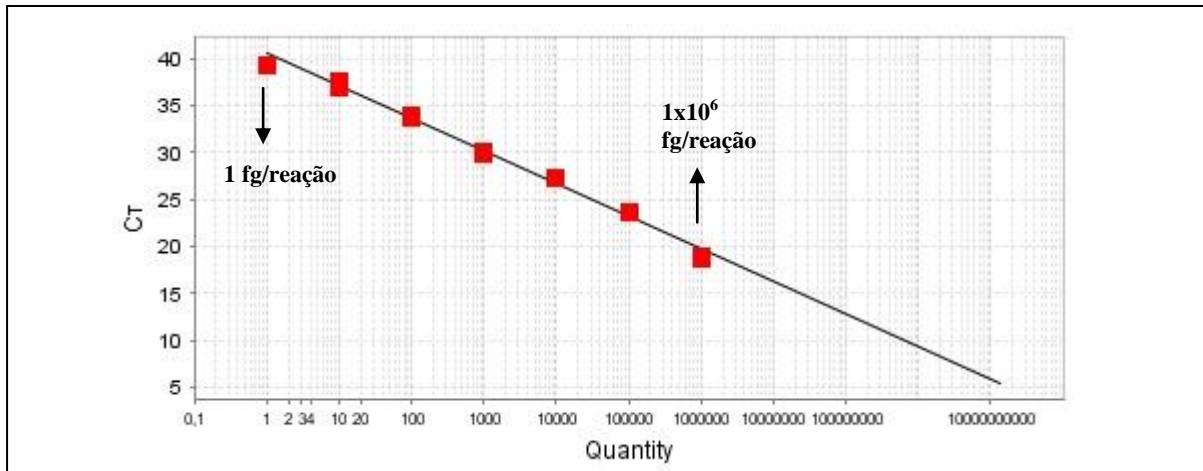


Fonte: elaborado pelo autor.

Nota: Análise de reprodutibilidade da duplex qPCR em sangue (200 μ L). Quantidades entre 1 fg e 1×10^6 fg (diluição 1:10) de DNA de *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) por reação (50 μ L) foram testadas. O limite alcançado de 1×10^3 fg (linha laranja), equivalente a $\sim 2 \times 10^2$ fg por μ L de amostra, foi reprodutível. C_t (ciclo *threshold*) da amostra: 33,84. Seta verde indica amplificação do gene G3PD (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), simultânea à quantidade de 1×10^3 fg de DNA do parasito.

Legenda: CN: controles negativos. Rn: *normalized reporter*.

Figura 9 – Curva-padrão de *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP 75), resultante do experimento de reprodutibilidade do ensaio duplex qPCR em sangue.



Fonte: elaborado pelo autor.

Nota: Quantidades entre 1 fg e 1×10^6 fg de DNA por reação (50 μ L) foram utilizadas. Slope: -3,479; coeficiente de determinação (R^2): 0,991; Eficiência (ϵ): 93,85%.

A partir do valor da eficiência analítica (ϵ), bem como do limite de detecção obtido, a reação duplex qPCR em sangue foi considerada otimizada. O Quadro 5 traz a composição final do *master mix*: os volumes e as concentrações dos reagentes, bem como as condições de ciclagem padronizadas para o novo ensaio.

Quadro 5 – Composição final do *master mix* e condições de ciclagem da nova duplex qPCR otimizada para a detecção simultânea do kDNA de *L. infantum* e do gene constitutivo G3PD de mamíferos.

Componentes	Volume/Tubo (μ L)	Concentração final
Água livre de DNase	5,0	–
TaqMan® Universal Master Mix (2X)	25,0	1X
LINF 1 23F	2,5	4 pmol/ μ L
LINF 1 154R	2,5	4 pmol/ μ L
Sonda A	2,5	3 pmol/ μ L
G1F	2,5	6 pmol/ μ L
G1R	2,5	6 pmol/ μ L
Sonda B	2,5	1 pmol/ μ L
DNA (<i>Template</i>)	5,0	
Total:	50,0	
Ciclagem: 95°C/15 s; 60°C/1 min.; 40 ciclos		

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: F: *primer forward*; R: *primer reverse*.

6.4 Avaliação das ferramentas diagnósticas

6.4.1 Teste de qPCR em amostras de urina

A análise de concordância realizada com as amostras de urina provenientes de pacientes dos Grupos 01 e 02 está exposta nas Tabelas 2 e 3.

No Grupo 02, a urina de 10 pacientes não foi obtida, e 2 pacientes foram excluídos devido à não amplificação do controle de qualidade amostral, permanecendo, portanto, 38 indivíduos para a análise.

As concordâncias obtidas entre a qPCR em urina e o conjunto de critérios diagnósticos para os Grupos 01 e 02 separadamente foram de 66,66% e 92,10%, respectivamente; em conjunto, a concordância obtida foi de 83,93%. Para todos os casos de análise, não houve diferença estatística significativa entre os testes (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise de concordância entre qPCR em urina e o conjunto de critérios, para o diagnóstico da LV em pacientes com suspeita clínica (Grupo 01), bem como em pacientes HIV positivos (Grupo 02) provenientes de hospitais de referência do estado de Pernambuco.

Testes	Positivo	Negativo	N	%	
qPCR em urina (Grupo 01)	04	14	18	100	
Conjunto de critérios diagnósticos	10	08	18	100	
Concordância Valor de <i>p</i> (Exato de Fisher)	04	08	12	66,66	0,0505
qPCR em urina (Grupo 02)	02	36	38	100	
Conjunto de critérios diagnósticos	03	35	38	100	
Concordância Valor de <i>p</i> (Exato de Fisher)	01	34	35	92,10	1,000
Concordância global (Grupos 01 e 02) Valor de <i>p</i> (Qui Quadrado)	05	42	47	83,93	0,1309

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda - *p*: nível de 5% e 1% de significância para Teste Qui Quadrado e Teste Exato de Fisher, respectivamente. O conjunto de critérios considera os métodos diagnósticos de referência para definição da positividade para LV (item 4.2.2).

Excluindo-se da análise do Grupo 01 os pacientes que receberam alguma dose do medicamento anti-*Leishmania*, a concordância entre os testes passa a ser de 92,31%, permanecendo sem diferença estatística significativa (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise de concordância entre qPCR em urina e conjunto de critérios para o diagnóstico da LV em pacientes com suspeita clínica (Grupo 01) e sem tratamento anti-*Leishmania*, provenientes de hospitais de referência do estado de Pernambuco.

Testes	Positivo	Negativo	N	%
qPCR em urina (Grupo 01)	04	09	13	100
Conjunto de critérios diagnósticos	05	08	13	100
Concordância	04	08	12	92,31
Valor de <i>p</i> (Exato de Fisher)				1,000

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda - *p*: nível de 1% de significância. O conjunto de critérios considera os métodos diagnósticos de referência para definição da positividade para LV (item 4.2.2).

Considerando apenas os pacientes do Grupo 01 que não receberam tratamento anti-*Leishmania*, a concordância obtida com os Grupos 01 e 02 em conjunto passa de 83,93% (Tabela 2) para 92,16%, com valor de *p* (Qui Quadrado) igual a 1,000 (sem diferença estatística entre os testes).

6.4.2 Teste de duplex qPCR em amostras de sangue

A análise de concordância realizada com as amostras de sangue provenientes de pacientes dos Grupos 01 e 02 pelo novo ensaio duplex qPCR foi realizada, e os resultados estão expostos nas Tabelas 4 e 5.

No Grupo 02, devido à não amplificação do controle de qualidade amostral, 1 paciente negativo na duplex foi excluído da análise, permanecendo 49 indivíduos.

As concordâncias obtidas entre a duplex qPCR e a qPCR para os Grupos 01 e 02 separadamente foram de 77,77% e 93,88%, respectivamente; em conjunto, foi de 89,55%. Para todos os casos de análise, não houve diferença estatística significativa entre os testes (Tabela 4).

Dos cinco pacientes do Grupo 01 que receberam tratamento anti-*Leishmania*, quatro (80%) apresentaram positividade para a duplex qPCR em sangue, dos quais três (75%) concordaram com qPCR simples.

Tabela 4 – Análise de concordância entre duplex qPCR e qPCR simples, para o diagnóstico da LV em pacientes com suspeita clínica (Grupo 01), bem como em pacientes HIV positivos (Grupo 02) provenientes de hospitais de referência do estado de Pernambuco.

Testes	Positivo	Negativo	N	%	
Duplex qPCR em sangue (Grupo 01)	06	12	18	100	
qPCR em sangue	08	10	18	100	
Concordância	05	09	14	77,77	
Valor de p (Qui Quadrado)					0,7324
Duplex qPCR em sangue (Grupo 02)	07	42	49	100	
qPCR em sangue	06	43	49	100	
Concordância	05	41	46	93,88	
Valor de p (Qui Quadrado)					1,000
Concordância global (Grupos 01 e 02)	10	50	60	89,55	
Valor de p (Qui Quadrado)					1,000

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda - p: nível de 5% de significância.

Na Tabela 5 pode ser observada a concordância obtida entre a duplex qPCR e o exame parasitológico - punção de medula óssea (Grupo 01). A concordância encontrada entre os testes foi de 60%, sem diferença estatística significativa.

Tabela 5 – Análise de concordância entre duplex qPCR e exame parasitológico, levando-se em consideração apenas os pacientes do Grupo 01 que foram submetidos ao diagnóstico (mielograma), provenientes de hospitais de referência do estado de Pernambuco.

Testes	Positivo	Negativo	N	%	
Duplex qPCR em sangue (Grupos 01)	4	1	5	100	
Diagnóstico parasitológico (mielograma)	4	1	5	100	
Concordância	3	0	3	60	
Valor de p (Exato de Fisher)					1,000

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda - p: nível de 1% de significância.

6.4.3 Avaliação das ferramentas como conjunto de critérios diagnósticos

As duas ferramentas foram avaliadas em conjunto para o diagnóstico da LV. A análise de concordância foi realizada frente ao conjunto de critérios diagnósticos definidos no item 4.2.2, e está expressa na Tabela 6.

Para o Grupo 02, foram considerados apenas os pacientes que tanto o sangue quanto a urina foram analisados, totalizando, portanto, 38 indivíduos.

Tabela 6 – Análise de concordância entre o conjunto de critérios composto pelos novos protocolos diagnósticos e o conjunto composto por técnicas de referência, para o diagnóstico da LV, a partir de amostras provenientes de pacientes com suspeita clínica (Grupo 01), bem como de pacientes HIV positivos (Grupo 02) provenientes de hospitais de referência do estado de Pernambuco.

Testes	Positivo	Negativo	N	%	
Duplex qPCR + qPCR em urina (Grupo 01)	08	10	18	100	
Conjunto de critérios diagnósticos	10	08	18	100	
Concordância	08	08	16	88,89	
Valor de p (Qui Quadrado)					0,7389
Duplex qPCR + qPCR em urina (Grupo 02)	05	33	38	100	
Conjunto de critérios diagnósticos	03	35	38	100	
Concordância	03	33	36	94,74	
Valor de p (Exato de Fisher)					0,7110
Concordância global (Grupos 01 e 02)	11	41	52	92,86	
Valor de p (Qui Quadrado)					1,0000

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda - p : nível de 5% e 1% de significância para Teste Qui Quadrado e Teste Exato de Fisher, respectivamente. O conjunto de critérios considera os métodos diagnósticos de referência para definição da positividade para LV (item 4.2.2).

Através da análise das ferramentas moleculares como um conjunto de critérios diagnósticos, a concordância com o conjunto de métodos de referência foi maior para as três análises de Grupos (Quadro 6). Não houve diferenças estatísticas significativas entre os dois conjuntos de testes.

Quadro 6 – Resumo das concordâncias percentuais obtidas através da análise entre as novas técnicas e as técnicas já consagradas pela literatura (de referência) para o diagnóstico da LV, utilizando amostras provenientes de diferentes Grupos de pacientes.

Grupo	qPCR em urina/ Conjunto de critérios diagnósticos (%)	Duplex qPCR/ qPCR simples (%)	Conjunto de critérios - Novas técnicas/ Testes de referência (%)
01	66,66	77,77	88,89
02	92,10	93,88	94,74
01 e 02	83,93	89,55	92,86

Fonte: elaborado pelo autor.

7 DISCUSSÃO

A biologia molecular tem conquistado posições cada vez mais importantes no estudo e na investigação das doenças infecto-parasitárias. A multiplicidade de aplicações e a acurácia na obtenção de dados são alguns dos fatores que podem justificar a sua intensa exploração no âmbito da pesquisa científica, na atualidade. Dentre as ferramentas moleculares, a PCR e suas variações vêm sendo empregadas para fins diagnósticos em diversas patologias, dentre elas as leishmanioses, com bons resultados sendo alcançados, tanto para humanos quanto para cães (VERMA et al., 2013a, 2013b).

Uma das várias vantagens inerentes a esse tipo de tecnologia é a possibilidade da utilização de uma grande variedade de amostras biológicas, dentre elas amostras de baixa ou nenhuma invasividade, tais como *swabs* conjuntivais e urina. Como consequência de tal vantagem, muitos trabalhos vêm unindo a qualidade do diagnóstico molecular na detecção de diferentes patologias ao conforto e segurança para o paciente e para o profissional de saúde que coleta e manipula os espécimes (FISA et al., 2008; GALAÏ et al., 2011).

A presença do material genético de *Leishmania* por lesões renais (glomerulares), bem como pela possível presença de formas amastigotas do parasito no trato urinário (FISA et al., 2008; SALGADO-FILHO et al., 2003) tornam viável a exploração deste espécime clínico para a detecção da LV em seres humanos, assim como o aspirado de medula óssea, a punção linfática, esplênica ou venosa. O uso de uma ferramenta de alta sensibilidade como a qPCR, associada a um sistema de *primers* específico podem contribuir para a detecção acurada do material genético do parasito na urina, mesmo em indivíduos que ainda apresentam integridade do seu sistema renal, em que o DNA tende a ser mais escasso. Em adição, através da quantificação do material genético pela qPCR torna-se possível estimar a carga parasitária do paciente, possibilitando dessa forma realizar o monitoramento de recidiva e de eficácia da terapêutica (SANTOS-MARQUES et al., 2012), especialmente importante para pacientes coinfectados HIV/LV (FISA et al., 2008).

Além das vantagens já discutidas atribuídas à biologia molecular, é importante destacar o constante aprimoramento tecnológico e a contínua busca pela superação de limitações que ainda persistem, tal como a ocorrência de resultados falso-negativos pela falta de adequabilidade do espécime examinado. O uso de controles de qualidade, baseados na amplificação de genes constitutivos do hospedeiro, pode auxiliar a identificar amostras degradadas ou com quantidades elevadas de inibidores, ou ainda indicar grandes perdas de material genético durante a extração do DNA (ANDREADOU et al., 2012; DE ALMEIDA-

FERREIRA et al., 2013, 2012). Graças à tecnologia inovadora de sondas direcionadas a diferentes alvos moleculares e marcadas com distintos corantes fluorescentes, a abordagem multiplex pôde ser aplicada também à qPCR, e portanto, trouxe a possibilidade de unir em uma mesma reação os sistemas para a detecção do DNA do agente etiológico, e para a garantia da qualidade amostral (LOMBARDO et al., 2012; PIRON et al., 2007). Como as duas ampliações ocorrem em um mesmo tubo, a estratégia auxilia na redução do tempo de processamento, e também na redução do custo por amostra (GONÇALVES et al., 2012), já que se trata basicamente da adição de um segundo sistema de *primers* mais as sondas *reporter* à reação uniplex.

O presente trabalho veio com o objetivo de avaliar diferentes estratégias baseadas em qPCR, para a detecção do kDNA de *L. infantum* em amostras de urina e sangue, com o intuito de aprimorar o diagnóstico molecular da LV. De acordo com o fluxograma estabelecido pelo Ministério da Saúde (2014a), a positividade para o exame de triagem (ICT) é suficiente para o estabelecimento do tratamento, devido ao risco inerente à patologia, ainda que haja a possibilidade do diagnóstico falso-positivo e que os medicamentos disponíveis tenham alta toxicidade. Neste contexto, a implementação de novas técnicas moleculares torna-se primordial para a confirmação rápida e confiável da LV. Neste estudo, duas ferramentas foram otimizadas e estatisticamente analisadas: qPCR em urina, para um diagnóstico acurado, simples e não invasivo, e duplex qPCR em sangue, para um diagnóstico simples e confiável, através da amplificação simultânea do DNA-alvo e do gene G3PD de mamíferos, o controle de qualidade endógeno.

Para a otimização da qPCR em urina, o sistema de *primers* LINF 1B foi avaliado utilizando-se amostras sabidamente positivas extraídas por diferentes procedimentos. A falta de padronização do método de extração de DNA escolhido entre diferentes linhas de pesquisa é um dos motivos que dificultam o estabelecimento de um padrão-ouro molecular para a detecção não só da LV, mas também de outras patologias infecto-parasitárias (COTA et al., 2012; CRUZ et al., 2013; ROCHA et al., 2010). Torna-se, portanto, fundamental que sejam avaliados alguns dos métodos de ampla utilização disponíveis, e que seja escolhido para o ensaio aquele eleito como o melhor, a partir de uma análise multifatorial.

Com o procedimento I, o sistema de *primers* LINF 1B conseguiu detectar DNA de *L. chagasi* em uma concentração de 5×10^1 fg/ μ L de urina, após a modificação realizada no protocolo original do kit (item 6.2). Ainda que possua um custo por amostra reduzido, a modificação tornou o procedimento mais prolongado e laborioso (Quadro 1). Em adição, o kit

não é indicado para a extração de urina, apesar de assegurar a remoção de alguns inibidores da *Taq* Polimerase comumente presentes na amostra, como proteínas, sais e EDTA (PROMEGA, 2012).

Com a extração pelo protocolo II, o sistema LINF 1B foi capaz de detectar material genético de *L. chagasi* em urina com 5×10^{-1} fg de DNA do protozoário por μL . O grande volume de amostra (5 ml) e o pequeno volume de eluição (20 μL) estão em parte relacionados ao bom resultado. Entretanto, é um método de alta laboriosidade, e que exige um tempo relativamente longo de processamento. Ainda, o protocolo exige o uso de substâncias químicas tóxicas (Fenol e Clorofórmio) e facilmente oxidáveis, capazes de degradar ácido nucléico (Fenol), caso haja imperícia na realização do procedimento. Além disso, é reconhecido pela baixa reprodutibilidade e risco de contaminação das amostras (SCHIJMAN et al., 2011). Ainda assim, é um método cujo protocolo favorece a remoção de inibidores (adequabilidade), além de possuir um baixo custo, aproximadamente R\$: 3,50 por amostra (DA SILVA et al., 2014), mas que pode se tornar mais oneroso com a oxidação dos reagentes.

Os procedimentos III e IV possuem metodologias semelhantes. O reduzido tempo de processamento e a praticidade de execução (baixa laboriosidade) são características compartilhadas. Entretanto, os dois kits possuem propriedades distintas significantes dentro do contexto do presente estudo: o kit III não assegura a inativação de inibidores desconhecidos da qPCR que podem estar presentes na urina; já o kit IV garante essa inativação, graças ao reagente de desnaturação chamado *QiaAmp Viral Lysis (AVL) Buffer* (QIAGEN, 2010), apresentando, portanto, maior adequabilidade ao espécime. Todavia, o seu custo por amostra é em média quatro vezes superior ao do kit III (Quadro 1).

Ainda que os quatro procedimentos de extração apresentados possuam alguma desvantagem, os limites de detecção obtidos em todos os métodos alcançaram a faixa que compreende quantidades em fentogramas de material genético (em cada μL de amostra), o que é considerado satisfatório para um ensaio molecular. Entretanto, para a urina, espécime escasso em DNA (principalmente em indivíduos com o sistema renal saudável) e rico em inibidores da *Taq* Polimerase, torna-se conveniente escolher um método de extração que tenha provido uma alta sensibilidade (≤ 5 fg/ μL), e que possua adequabilidade à amostra. O método III, além de ser rápido e prático, possui a capacidade de remover inibidores comumente presentes em urina, como sais, proteínas e outros contaminantes. Por esses motivos, e também por possuir um custo razoável, o método foi o escolhido para ser incorporado ao ensaio molecular.

A qPCR em urina foi então otimizada e a reprodutibilidade do ensaio avaliada, alcançando um excelente valor de eficiência (ϵ) analítica (Figuras 4 e 5). Apesar da concentração de 5 fg/ μ L ter sido considerada como o limite de detecção da técnica otimizada, o novo protocolo foi capaz de detectar o DNA de *L. chagasi* em concentrações inferiores (5×10^{-1} fg/ μ L de urina, $\sim 0,0034$ parasitos) (Figura 4), o que reforça a sua alta sensibilidade analítica. Entretanto, o limite inferior obteve um C_t elevado ($>36,00$), além de não ter apresentado uma reprodutibilidade similar à concentração de 5 fg/ μ L.

Para a otimização da duplex qPCR, foram desenhadas e sintetizadas duas novas sondas TaqMan[®] direcionadas ao interior do DNA-alvo amplificado pelos sistemas LINF 1B e G3PD1. Com o objetivo de favorecer em multiplex a amplificação do material genético do agente etiológico, a sonda A foi desenhada de forma a ter uma maior compatibilidade com as condições de ciclagem padronizadas para o sistema LINF 1B (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009), em relação à sonda B (sistema G3PD1). Esse favorecimento foi verificado já nos experimentos iniciais de otimização, com a amplificação mais precoce do DNA de *L. chagasi* (C_t : 12,0 – 14,0) em comparação ao gene G3PD (C_t : 30,0 – 33,0). O bom funcionamento das sondas foi obtido em todas as concentrações testadas (Figuras 6 e 7).

Depois de otimizada, a ferramenta molecular alcançou um limite de detecção de 1×10^3 fg, equivalente a aproximadamente 1,4 parasito a cada μ L de sangue, com uma excelente eficiência (ϵ) analítica (Figuras 8 e 9). Apesar da amplificação simultânea dos dois alvos ter ocorrido a partir da concentração de 1×10^4 fg, a aplicabilidade do teste não foi prejudicada, uma vez que a não amplificação do controle endógeno em uma amostra positiva não invalida o teste. A competição entre os sistemas pelos reagentes é o provável motivo da não amplificação do gene G3PD em reações com concentrações maiores do DNA de *L. chagasi* (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2014a, 2014b).

Após o processo de otimização e análise de reprodutibilidade, as duas ferramentas foram avaliadas através de testes em amostras provenientes de diferentes Grupos de pacientes: indivíduos com suspeita clínica de LV residentes em áreas endêmicas e indivíduos HIV positivos. As análises de concordância se deram através de comparações com os métodos parasitológico, sorológico e molecular, consagrados pela literatura.

A análise de concordância entre a qPCR em urina e o conjunto de critérios diagnósticos (descrito no item 4.2.2) demonstrou bons valores, sobretudo com o Grupo 02 (92,10%). Após desconsiderar da análise do Grupo 01 os pacientes que receberam alguma dose do antimoníaco de N-metilglucamina (Glucantime[®]) antes da coleta do material

biológico, a concordância entre os testes passou de 66,66% para 92,31% (Tabelas 2 e 3), demonstrando assim uma provável intervenção do medicamento sobre a quantidade de DNA filtrada a nível glomerular. Fisa et al. (2008) utilizaram nPCR para a detecção do DNA de *L. infantum* em urina de pacientes com ou sem coinfeção HIV/LV. A positividade para pacientes com episódio clínico foi de 88%, enquanto que para os tratados (Anfotericina B ou Glucantime[®], de um mês a três anos), foi de 25%. Os resultados indicam que a carga parasitária, bem como a alteração da função renal tenderam à redução com a implementação do tratamento. Todos os pacientes que realizaram o mielograma já haviam sido submetidos ao tratamento, o que pode justificar a baixa concordância com a técnica (20%). Portanto, a partir dos resultados obtidos no presente estudo, a aplicação da ferramenta poderá ser direcionada para a confirmação de indivíduos com suspeita clínica ainda sem tratamento e atendidos em hospitais de referência, bem como para o monitoramento da eficiência terapêutica, posteriormente à análise e acompanhamento de pacientes em tratamento.

Pacientes HIV positivos são mais susceptíveis à LV e às recidivas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014c), dessa forma, um diagnóstico quantitativo acurado e confortável torna-se fundamental (MOTAZEDIAN et al., 2008), já que os métodos sorológicos tendem a perder sua acurácia em indivíduos imunossuprimidos, além de não diferenciarem reativações (CHAPPUIS et al., 2007; DESJEUX; ALVAR, 2003). Neste estudo, uma alta taxa de coinfeção (12%) foi obtida entre os 50 soropositivos, corroborando assim com a atual situação de disseminação de ambas as doenças (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014b; ALVAR, 2008). Devido a não obtenção da urina de alguns pacientes LV positivos, apenas três indivíduos HIV/LV do Grupo 02 foram inseridos para a avaliação de concordância entre os testes. A partir da análise e do acompanhamento de um maior número de coinfectados com e sem a administração de tratamento anti-*Leishmania*, a aplicabilidade do novo protocolo para o monitoramento de recidivas e da terapêutica para este Grupo poderá ser avaliada, configurando, portanto, uma das perspectivas do trabalho.

Manna et al. (2008) e Solano-Gallego et al. (2007) demonstraram, em modelo animal (cão), a relação entre alteração de função renal e existência de DNA de *Leishmania* em urina. Todavia, no presente estudo, dos quatro indivíduos do Grupo 01 que não receberam tratamento e que foram positivos na qPCR em urina, apenas um (P3 – Tabela 1) apresentou valores séricos de U e C elevados (sugerindo insuficiência renal). Assim, a ferramenta mostrou-se capaz de detectar o material genético de *L. infantum* em urina mesmo em pacientes sem lesão renal, provavelmente devido à filtração, a nível glomerular, de

fragmentos do DNA do agente etiológico livres na corrente sanguínea (FRANCHESCHI et al., 2007; SU et al., 2004). No Grupo 02, apenas um paciente positivo pela qPCR em sangue (54,95 fg) apresentou U e C elevada; entretanto, mostrou-se negativo para a qPCR em urina.

As análises com os Grupos 01 e 02 separados e em conjunto não demonstraram diferenças estatísticas significativas com o conjunto de critérios diagnósticos, reforçando assim a potencial aplicabilidade do novo ensaio molecular, para um diagnóstico prático e acurado da LV, nas situações descritas acima.

Para a duplex qPCR em sangue, a análise de concordância foi inicialmente realizada com o ensaio qPCR já padronizado e consagrado pela literatura (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009), com a finalidade de avaliar se mesmo após a inclusão de um controle de qualidade amostral, o ensaio se manteria reprodutível em relação ao protocolo já validado. Após a análise, uma boa concordância percentual foi observada com os Grupos 01 e 02 (77,77 e 93,88%, respectivamente), sem diferenças estatísticas significativas em nenhuma das análises de Grupos (Tabela 4).

Diferentemente da qPCR em urina, a duplex qPCR foi capaz de detectar o DNA de *L. infantum* em quatro das cinco amostras de sangue provenientes dos cinco pacientes que receberam ao menos uma dose do Glucantime[®] (Grupo 01), positivos de acordo com o conjunto de critérios diagnósticos. O único paciente negativo (P6 – Tabela 1) já havia recebido 18 doses do medicamento, e também se apresentou negativo em qPCR. Três de cinco pacientes (60%) foram concordantes entre mielograma e o novo ensaio (Tabela 5), entretanto, um dos discordantes (P4 – Tabela 1) apresentou-se positivo pelo conjunto de critérios. No Grupo 02, a duplex qPCR foi concordante em 46 de 49 amostras, inclusive em cinco de seis amostras de indivíduos não tratados e positivos em qPCR. Resultados negativos discordantes nos Grupos 01 e 02 foram possivelmente relacionados à baixa carga parasitária dos espécimes (\bar{X} : 24,29 fg e 8,18 fg, respectivamente), (Tabela 1).

Portanto, a ferramenta apresentou resultados que a tornam potencialmente aplicável para o diagnóstico confirmatório da LV com ou sem o início da terapêutica, inclusive para pacientes HIV positivos, sem perdas significativas em relação ao protocolo qPCR já validado, mesmo possuindo uma menor sensibilidade analítica. O uso da ferramenta para o monitoramento da eficácia terapêutica e da recidiva poderá ser melhor avaliado a partir de um maior “n” amostral e também do acompanhamento de pacientes antes e durante o tratamento.

Gonçalves-de-Albuquerque et al. (2014b) padronizaram ensaios multiplex cPCR para a detecção da LV e LT em cães, simultânea à análise da qualidade amostral. A partir de testes

em amostras de campo, foi observado que mais de 15% delas apresentaram-se inadequadas para a definição diagnóstica, mostrando assim a importância da utilização dos controles na prevenção de resultados falso-negativos. No presente estudo, das 55 amostras submetidas à duplex qPCR com resultado negativo, apenas uma não amplificou o controle endógeno. Em prática, o exame precisaria ser repetido, garantindo assim um resultado mais seguro.

A concordância percentual alcançada pela combinação dos dois novos protocolos em relação aos métodos diagnósticos de referência aumentou para todas as análises de Grupos (Quadro 6 e Tabela 6). Dessa forma, uma associação de ambos os testes como um conjunto de critérios poderá promover uma maior acurácia no diagnóstico da LV. Entretanto, um protocolo ou outro poderá ser empregado, a depender da situação específica: qPCR em urina, para pacientes sem tratamento anti-*Leishmania*, com ou sem alteração de função renal, em que um espécime não invasivo torna-se conveniente; ou duplex qPCR, para pacientes que já tenham ou não recebido alguma dose de medicamento anti-*Leishmania*, e que estejam impossibilitados de fornecer a urina (infecção urinária, hemodiálise, dentre outras situações). Apesar dos bons resultados, será a partir da obtenção dos indicadores de validade clínica, no processo de validação, que uma maior visão da aplicabilidade dos novos protocolos poderá ser obtida.

Os dois novos ensaios otimizados neste trabalho mostraram-se promissores para a inclusão no diagnóstico da LV, trazendo ainda o aperfeiçoamento das ferramentas moleculares, para que sejam complementares às técnicas convencionais de rotina e suas limitações, mesmo em uma população clinicamente heterogênea de pacientes.

8 CONCLUSÕES

A investigação dos protocolos de extração de DNA em urina mostrou que existem grandes diferenças entre os procedimentos em relação, por exemplo, ao rendimento, ao custo e à laboriosidade, e que uma escolha errônea pode prejudicar a sensibilidade e a viabilidade do ensaio diagnóstico. A incorporação do método de extração mais adequado refletiu-se nos resultados obtidos pelas análises comparativas.

A partir dos resultados das análises comparativas com ensaios de referência já consagrados em literatura, tanto a qPCR em urina quanto a duplex qPCR mostraram-se como protocolos promissores para o complemento e o aprimoramento do diagnóstico da leishmaniose visceral.

O uso de ambos os ensaios como um conjunto de critérios para a definição diagnóstica da LV determinou melhor concordância com o conjunto dos métodos de referência; entretanto, a depender de situações específicas, como o início ou não da terapêutica ou dificuldade para a obtenção de algum dos espécimes clínicos trabalhados, a escolha pelo ensaio mais adequado poderá ser realizada.

Os novos métodos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas com o conjunto de técnicas analisado, mesmo utilizando diferentes grupos de pacientes (HIV positivos ou não), o que indica a ampla e potencial aplicabilidade dos protocolos padronizados.

Portanto, após validação, os ensaios moleculares poderão ser inseridos para a definição dos casos de LV, em centros de referência, trazendo mais conforto, praticidade, confiabilidade e rapidez ao diagnóstico da patologia. Através da detecção precoce e acurada dos reservatórios, a redução de incidência da LV tenderá a ocorrer, trazendo benefício para população como um todo.

9 PERSPECTIVAS

Através de um maior "n" amostral, e a partir do acompanhamento de pacientes anteriormente e posteriormente ao início do tratamento específico anti-*Leishmania*, determinar a viabilidade das ferramentas para o monitoramento da recidiva e da eficácia terapêutica;

Validar ambos os protocolos nas respectivas amostras (qPCR em urina e duplex qPCR em sangue), provenientes de pacientes com suspeita clínica de LV; a partir da obtenção dos indicadores de validade clínica (sensibilidade, especificidade e eficiência), promovendo a aplicabilidade das ferramentas no diagnóstico definitivo da patologia.

REFERÊNCIAS

- ABEIJON, C.; CAMPOS-NETO, A. Potential Non-invasive Urine-Based Antigen (Protein) Detection Assay to Diagnose Active Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e2161, 2013.
- ALMEIDA, M. A. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.127, n. 3-4, p. 227-232, 2005.
- ALVAR, J. et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 21, p. 334-359, 2008
- ALVAR, J. et al. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n 5, p. e35671, 2012
- ANDREADOU, M. et al. Evaluation of the performance of selected in-house and commercially available PCR and real-time PCR assays for the detection of *Leishmania* DNA in canine clinical samples. **Experimental Parasitology**, New York, v. 131, p. 419-424, 2012.
- ANKLAM, E. et al. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 214, p. 3-26, 2002.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **User Bulletin #2 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System**, Waltham, 2001a. 36 p. Disponível em: <docs.appliedbiosystems.com/pebi docs/04303859.pdf>. Acesso em: 8 mar. 2014.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **User Bulletin #5 ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System**, Waltham, 2001b. 20 p. Disponível em: <docs.appliedbiosystems.com/pebi docs/04306236.pdf>. Acesso em: 8 mar. 2014.
- ASHFORD, R.W. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 30, p. 269-1281, 2000.
- AYRES, M. et al. **BIOESTAT: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007.
- BASIYE, F. L. Sensitivity and specificity of the *Leishmania* OligoC-TesT and NASBA-oligochromatography for diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 15, n. 7, p. 806-810, 2010.
- BIGELI, J. M.; JÚNIOR, W. P. O.; TELES, N. M. M. Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 45, n. 1, p. 18-23, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação Epidemiológica da LV**. Brasília, 2014b. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados>> Acesso em: 6 nov. 2014.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Tegumentar Americana Leishmaniose Visceral. In: _____. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009. 64 p., p 1-57 (caderno, v. 7).

BRASIL. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2007. 182p.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014a. 120p.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2013. 55p.

BRINKMAN, J. A. et al. Optimization of PCR based detection of human papillomavirus DNA from urine specimens. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 29, p. 230-240, 2004.

CARSON, C. et al. Comparison of *Leishmania* OligoC-TesT PCR with Conventional and Real-Time PCR for Diagnosis of Canine *Leishmania* Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 9, p. 3325-3330, 2010.

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 and Hygiene**, Deerfield, v. 78, p.122-132, 2008.

CHAOUCH, M. et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Leishmania infantum* canine leishmaniasis based on cysteine protease B genes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 15, n. 198, p. 78-84, 2013.

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.

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

COTA, G. F. et al. The Diagnostic Accuracy of Serologic and Molecular Methods for Detecting Visceral Leishmaniasis in HIV Infected Patients: Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 5, e1665, 2012.

- CRUZ, I. et al. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, New York, v. 134, p. 281-289, 2013.
- DA SILVA, L. A. et al. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 10, p. 77-83, 2010.
- DA SILVA, M. A. L. A comparison of four DNA extraction protocols for the analysis of urine from patients with visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 47, n. 2, p. 193-197, 2014.
- DA SILVA, M. A. L. et al. Optimization of single-tube nested PCR for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, New York, v. 134, p. 206-210, 2013.
- DE ALMEIDA-FERREIRA, S. et al. Canine Skin and Conjunctival Swab Samples for the Detection and Quantification of *Leishmania infantum* DNA in an Endemic Urban Area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 4, p. e1596, 2012.
- DE ALMEIDA-FERREIRA, S. et al. Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. e2150, 2013.
- DE VRIES, P. J. et al. Quantification of the response to miltefosine treatment for visceral leishmaniasis by QT-NASBA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 100, p. 1183-1186, 2006.
- DESJEUX P, ALVAR J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 97, p. 3-15, 2003.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 14, p. 417-423, 1996.
- ESPY, M. J. et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.19, p. 65-256, 2006.
- FISA, R. et al. *Leishmania infantum* DNA Detection in Urine from Patients with Visceral Leishmaniasis and after Treatment Control. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 78, n. 5, p. 741-744, 2008.
- FRAGA, T. L. et al. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 3, p. 310-313, 2010.

- FRANCESCHI, A. et al. Occurrence of *Leishmania* DNA In Urines of Dogs Naturally Infected with Leishmaniasis. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 31, p. 335-341, 2007.
- GALAI, Y. et al. Diagnosis of Mediterranean Visceral Leishmaniasis by Detection of *Leishmania* Antibodies and *Leishmania* DNA in Oral Fluid Samples Collected Using an Oracol Device. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, p. 3150-3153, 2011.
- GILSBACH, R. et al. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real time PCR data. **BioTechniques**, Orlando, v. 40, p. 173-177, 2006.
- GOMES Y. M. et al. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **British Veterinary Journal**, London, v. 175, p. 45-52, 2008.
- GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. C. et al. Inclusion of Quality Controls on Leishmaniasis Molecular Tests to Increase Diagnostic Accuracy in Research and Reference Laboratories. **Molecular Biotechnology**, Totowa, 2014b. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12033-014-9825-2>> Acesso em: 10 set. 2014.
- GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. C. et al. Tracking false-negative results in molecular diagnosis: proposal of a triplex-PCR based method for leishmaniasis diagnosis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 20, n. 16, 1-6, 2014a.
- 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**, Botucatu, v. 18 n. 2, p. 188-197, 2012.
- HARHAY, M.O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 27, p. 403-409 2011.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, London, v. 354, p. 1191-1199, 1999.
- IKONOMOPOULOS, J. et al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 113, p. 99-113, 2003.
- KASHINO, S. S. et al. Identification of *L. infantum chagasi* proteins in VL patients' urine: a promising antigen discovery approach of vaccine candidates. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 34, n. 7, p. 360-371, 2012.
- KHAN, M. G. M. et al. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. **Parasites & Vectors**, London, v. 5, p. 280-287, 2012.
- LE FICHOUX, Y. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 1953-1957, 1999.
- LEITE, R. S. et al. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 170, p. 201-206, 2010.

LEITE, R. S. The use of conjunctival swab samples for PCR screening for visceral leishmaniasis in vaccinated dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 36-41, 2011.

LOMBARDO, G. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 184, p. 10-17, 2012.

MAIA, C. et al. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 174, p. 336-340, 2010.

MANNA, L. et al. Urine sampling for real-time polymerase chain reaction-based diagnosis of canine leishmaniasis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 20, p. 64-67, 2008.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Epidemiological patterns of mortality due to visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection in Brazil, 2000-2011. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 108, n. 6, p. 338-347, 2014.

MARZOCHI, M. C. A.; MARSDEN, P. P. **Ecologia e controle de vetores -Leishmanioses**. Trabalho apresentado no Encontro Nacional sobre Saúde e Meio Ambiente (Fiocruz), Rio de Janeiro, 1991.

MOHAMMADIHA, A. et al. Canine visceral leishmaniasis: A comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 192, p. 83-90, 2013b.

MOHAMMADIHA, A. et al. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. **Experimental Parasitology**, New York, v. 133, p. 89-94, 2013a.

MOTAZEDIAN, M. et al. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 60, p. 151-154, 2008.

MUGASA, C. M. et al. Accordance and concordance of PCR and NASBA followed by oligochromatography for the molecular diagnosis of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania*. **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v. 15, n. 7, p. 800-805, 2010.

NARANJO, C. et al. Evaluation of the presence of *Leishmania* spp. by real-time PCR in the lacrimal glands of dogs with leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, London, v. 193, p. 168-173, 2012.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 12ª edição. Rio de Janeiro, Ed. Atheneu Rio, 2011. 264 p.

NOAZIN, S. et al. First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. **Vaccine**, Kidlington, v. 26, n 52, p. 6759-6767, 2008.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 28, n. 12, p. e63, 2000.

OLIVEIRA, A. P. et al. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 387, n. 1-2, p. 245-53, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **African Health Observatory**, Geneva, 2014b. Disponível em: <http://www.who.int/profiles_information/index.php/AFRO:Leishmaniasis/>. Acesso em: 7 mar. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis**. Geneva, 2014a. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 6 nov. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis: burden and distribution: Leishmaniasis and HIV coinfection**, Geneva, 2014c. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/>. Acesso em: 9 nov. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Expert Committee on the Control of *Leishmaniases*. **Control of the Leishmaniasis**. Geneva, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection**. Addis Ababa, 2007.

OZENSOY-TOZ, S. et al. A Real-Time ITS1-PCR Based Method in the Diagnosis and Species Identification of *Leishmania* Parasite from Human and Dog Clinical Samples in Turkey. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e2205, 2013.

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, v. 27, n. 3-4, p. 122-128, 2013.

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**, London, v. 182, n. 2, p. 356-358, 2009.

PANDEY, K. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by polymerase chain reaction of DNA extracted from Giemsa's solution-stained slides. **Parasitology Research**, Berlin, v. 107, p. 727-730, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis and HIV coinfection**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/>. Acesso em: 4 nov. 2014.

PIRON, M. et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. **Acta Tropica**, Basel, v. 103, p. 195–200, 2007.

POURABBAS, B. et al. Quantification of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA for monitoring the response to meglumine antimoniate therapy in visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 88, n. 5, p. 868-871, 2013.

PROMEGA. **Wizard® Genomic DNA Purification Kit**: Instructions for use of Product. Wisconsin, Madison, 2012. 20 p.

QIAGEN. Sample and Assay Technologies. **QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook**.02/2003, 68 p. Disponível em: <https://www.tufts.edu/~mcourt01/.../QIAGEN_protocol.pdf> Acesso em: 8 mar. 2014.

QIAGEN. Sample and Assay Technologies. **QIAamp® Viral RNA Mini Handbook**, 3 ed. 2010. Disponível em: <<http://www.qiagen.com/br/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en>>. Acesso em: 13 maio 2013.

QUARESMA, P. F. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, Basel, v. 111, n. 3, p. 289-294, 2009.

RAHMAN, K. M.; ISLAM, S.; RAHMAN, M. W. Increasing incidence of post-kala-azar dermal leishmaniasis in a population-based study in Bangladesh. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 50, p. 73-76, 2010.

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

REIS, L. E. S. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 197, p. 498-503, 2013.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

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

REY, L. **Parasitologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 888 p.

RIERA, C. et al. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 98, p. 102-110, 2004.

ROCHA, L. S. et al. Molecular biological identification of monoxenous trypanosomatids and *Leishmania* from antropophilic sand flies (Diptera: Psychodidae) in Southeast Brazil. **Parasitology Research**, Berlin, v. 107, p. 465-468, 2010.

- RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of Kinetoplast DNA as a Tool in the Detection and Diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, New York, v. 71, p. 267-275, 1990.
- RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M. Real-time PCR in Food Science: Introduction. **Current Issues in Molecular Biology**, Wymondham, v. 15, p. 25–38, 2013.
- ROELFSEMA, J. H. et al. Evaluation and improvement of two PCR targets in molecular typing of clinical samples of *Leishmania* patients. **Experimental Parasitology**, New York, v. 127, p. 36-41, 2011.
- ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America – a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, p. e584, 2010.
- SACKETT, D. L.; HAYNES, R. B. Evidence base of clinical diagnosis: The architecture of diagnostic research. **British Medical Journal**, London, v. 324, p. 539-541, 2002.
- SALGADO-FILHO N. et al. Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 36, p. 217-221, 2003.
- SANTOS-MARQUES, L. H. S. et al. Low Parasite Load Estimated by qPCR in a Cohort of Children Living in Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 12, p.e1955, 2012.
- SCHIJMAN, A.G. et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, p. e931, 2011.
- SHAFIEI, R. et al. Emergence of co-infection of visceral leishmaniasis in HIV-positive patients in northeast Iran: A preliminary study. **Travel Medicine and Infectious Diseases**, Amsterdam, v. 12, n. 173-178, 2014.
- SHANG, L. et al. The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in Sichuan Province, southwestern China detected by real time PCR. **Parasites & Vectors**, London, v. 4, p. 173-177, 2011.
- SINHA, P. K.; PANDY, K.; BHATTACHARYA, S. K. Diagnosis & management of Leishmania/HIV co-infection. **The Indian Journal of Medical Research**, New Dheli, v. 121, p. 407-414, 2005.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 147, p. 315-319, 2007.
- SOUSA, S. et al. Development of a fluorescent based immunosensor for the serodiagnosis of canine leishmaniasis combining immunomagnetic separation and flow cytometry. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 8, p. e2371, 2013.

SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of Indian Visceral Leishmaniasis by Nucleic Acid Detection Using PCR. **PLoS one**, San Francisco, v. 6, n. 4, p. e19304, 2011b.

SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 105, p. 1-6, 2011a.

STARK, D. et al. Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis Due to *Leishmania infantum* Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patient. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 3, p. 1178-1180, 2006.

SU, Y. H. et al. Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-size, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer. **Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v. 6, p. 101-107, 2004.

SUDARSHAN, M. et al. Study of parasite kinetics with antileishmanial drugs using real-time quantitative PCR in Indian visceral leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 66, p. 1751-1755, 2011.

SUNDAR, S. et al. Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a Latex agglutination test. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 73, n. 2, p. 269-271, 2005.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

THAKUR, C. P.; KUMAR, K. Post kala-azar dermal leishmaniasis: a neglected aspect of kala-azar control programmes. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 86, n. 4, p. 355-359, 1992.

THEKISOE, O. M. M. et al. Stability of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Reagents and its Amplification Efficiency on Crude Trypanosome DNA Templates. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 71, n. 4, p. 471-475, 2009.

TOO, H. P. Real Time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. **Molecular Brain Research**, Amsterdam, v. 114, p. 146-154, 2003.

VAISH, M. Noninvasive Molecular Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 5, p. 2003-2005, 2011.

VAN DER MEIDE, W. et al. Comparison between Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, Real-Time Reverse Transcriptase PCR, and Real-Time PCR for Quantification of *Leishmania* Parasites. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 2, p. 73-78, 2008.

VERMA, S. et al. Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 75, p. 390-395, 2013b.

VERMA, S. et al. Reliable diagnosis of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) using slit aspirate specimen to avoid invasive sampling procedures. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 268-275, 2013a.

WANG, J. Y. The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in western China detected by PCR and serological tests. **Parasites & Vectors**, London, v. 4, p. 69-76, 2011.

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.

ZINK, A. R. et al. Leishmaniasis in ancient Egypt and Upper nubia. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, p. 1616-1617, 2006.

APÊNDICE A - TCLE para adulto

CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES

DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTO

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa ‘**Avaliação da técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico da leishmaniose visceral em amostras de urina**’, sob a responsabilidade do pesquisador Rômulo Pessoa e Silva, cujo objetivo é estudar a eficiência da urina como amostra biológica para o diagnóstico da leishmaniose visceral pela pesquisa de DNA do micróbio. A partir disto, um diagnóstico mais simples, rápido e confortável para o paciente com a doença poderá ser proporcionado.

Será realizada uma coleta de 30 - 50 mL (10 – 20 colheres de sopa) de urina para pesquisar substâncias liberadas (material genético, DNA) pelo micróbio do Calazar, e 1 – 10 mL (1 – 5 colheres de sopa) de sangue coletado na veia para identificar substâncias que o corpo humano produz contra o micróbio (anticorpo) e para pesquisar o DNA do micróbio de Calazar. Caso também seja indicação clínica, será feita uma coleta do líquido presente dentro do osso, obtido por punção na medula óssea (mielograma), sendo esse recomendado pelo Ministério da Saúde como melhor exame no diagnóstico do micróbio de Calazar e a pesquisa de material genético (DNA) desse micróbio.

Todos os exames serão coletados com material estéril (nunca usados e “sem micróbios”), sendo realizados por profissionais capacitados do próprio hospital. O exame na veia não causa nenhum desconforto além da “picada” da agulha que pode algumas vezes causar uma pequena mancha roxa (hematoma) que desaparece em alguns dias sem qualquer tratamento. É esperado que após a coleta do líquido presente dentro do osso possa haver um pequeno sangramento e dor no local, que desaparece em alguns dias sem qualquer tratamento ou apenas com o uso de remédio para dor.

Os resultados dos exames (teste imunocromatográfico rK39, mielograma e a reação de cadeia de polimerase) aos quais a urina e/ou sangue serão submetidos, serão entregues ao Sr (a) e ao seu médico assistente que deixará o resultado no seu prontuário. Na dependência do(s) resultado(s) positivo(s), será realizado acompanhamento pelo médico e/ou tratamento para Calazar na Unidade hospitalar de origem. Esses exames serão importantes para o

tratamento do (a) Sr (a), pois o diagnóstico de Calazar, quando feito cedo e com certeza, contribui para que seu tratamento seja realizado de forma mais segura, com redução do tempo de internação e com recuperação mais rápida.

Se depois de consentir em sua participação o (a) Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhuma forma de prejuízo ao seu acompanhamento clínico e terapêutico. O (A) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração.

A Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) irá conservar, sob sua guarda, qualquer amostra de sangue, líquido de medula ou urina para exame de laboratório, até que esta pesquisa seja concluída, e então todo o material será devidamente descartado. Os resultados dos exames, assim como os da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir da pesquisa poderão ser utilizados nas pesquisas futuras.

Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador Rômulo Pessoa e Silva no endereço Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária | Recife/PE – Brasil, pelo telefone (81) 2101-2679.

Consentimento pós-informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Recife, ____ de _____ de 20 ____

Assinatura do paciente



Impressão do dedo polegar

Nome: _____

Caso não saiba assinar

Assinatura e nome do Membro da Equipe de Pesquisa

Endereço - Rua (participante) e Telefone

APÊNDICE B - TCLE para menor de idade

CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES

DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENOR DE IDADE

Convidamos o menor sob a responsabilidade do (a) Sr (a) para participar da Pesquisa **‘Avaliação da técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico da leishmaniose visceral em amostras de urina’**, que tem como responsável o pesquisador Rômulo Pessoa e Silva, e cujo objetivo é estudar a eficiência da urina como amostra biológica para o diagnóstico da leishmaniose visceral pela pesquisa de DNA do micróblio. A partir disto, um diagnóstico mais simples, rápido e confortável para o paciente com a doença poderá ser proporcionado.

Será realizada uma coleta de 30 - 50 mL (10 – 20 colheres de sopa) de urina para pesquisar substâncias liberadas (material genético, DNA) pelo micróblio do Calazar, e 1 – 10 mL (1 – 5 colheres de sopa) de sangue coletado na veia para identificar substâncias que o corpo humano produz contra o micróblio (anticorpo) e para pesquisar o DNA do micróblio de Calazar. Caso também seja indicação clínica, será feita uma coleta do líquido presente dentro do osso, obtido por punção na medula óssea (mielograma), sendo esse recomendado pelo Ministério da Saúde como melhor exame no diagnóstico do micróblio de Calazar e a pesquisa de material genético (DNA) desse micróblio.

Todos os exames serão coletados com material estéril (nunca usados e “sem micróblios”), sendo realizados por profissionais capacitados do próprio hospital. O exame na veia não causa nenhum desconforto além da “picada” da agulha que pode algumas vezes causar uma pequena mancha roxa (hematoma) que desaparece em alguns dias sem qualquer tratamento. É esperado que após a coleta do líquido presente dentro do osso possa haver um pequeno sangramento e dor no local, que desaparece em alguns dias sem qualquer tratamento ou apenas com o uso de remédio para dor.

Os resultados dos exames (teste imunocromatográfico rK39, mielograma e a reação de cadeia de polimerase) aos quais a urina e/ou sangue serão submetidos, serão entregues ao Sr (a) e ao médico assistente que deixará o resultado no prontuário do menor o qual o (a) Sr (a)

se responsabiliza. Na dependência do(s) resultado(s) positivo(s), será realizado acompanhamento do menor pelo médico e/ou tratamento para Calazar na Unidade hospitalar de origem. Esses exames serão importantes para o tratamento, pois o diagnóstico de Calazar, quando feito cedo e com certeza, contribui para que o tratamento seja realizado de forma mais segura, com redução do tempo de internação e com recuperação mais rápida.

Se depois de consentir a participação do menor o (a) Sr (a) desistir de que o mesmo continue participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhuma forma de prejuízo ao acompanhamento clínico e terapêutico da pessoa que o (a) Sr (a) se responsabiliza. O (a) Sr (a) e o menor não terão nenhuma despesa e também não receberão nenhuma remuneração.

A Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) irá conservar, sob sua guarda, qualquer amostra de sangue, líquido de medula ou urina para exame de laboratório, até que esta pesquisa seja concluída, e então todo o material será devidamente descartado. Os resultados dos exames, assim como os da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade e a do menor não serão divulgadas, sendo guardadas em sigilo. Os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir da pesquisa poderão ser utilizados nas pesquisas futuras.

Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador Rômulo Pessoa e Silva no endereço Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária | Recife/PE – Brasil, pelo telefone (81) 2101-2679.

Consentimento pós-informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da colaboração do menor sob minha responsabilidade, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo que o mesmo participe do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso retirar o consentimento quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim, pelo paciente e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Recife, _____ de _____ de 20_____

Nome: _____

Assinatura e nome do paciente

Assinatura do (a) responsável



Impressão do dedo polegar
Caso não saiba assinar

Nome: _____

Assinatura e nome do Membro da Equipe de Pesquisa

Endereço - Rua (participante) e Telefone

APÊNDICE C - TCLE para Grupo controle

CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES

DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA GRUPO CONTROLE

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa **‘Avaliação da técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico da leishmaniose visceral em amostras de urina’**, sob a responsabilidade do pesquisador Rômulo Pessoa e Silva, cujo objetivo é estudar a eficiência da urina como amostra biológica para o diagnóstico da leishmaniose visceral pela pesquisa de DNA do micróbio. A partir disto, um diagnóstico mais simples, rápido e confortável para o paciente com a doença poderá ser proporcionado.

Será realizada uma coleta de 30 - 50 mL (10 – 20 colheres de sopa) de urina para pesquisar substâncias liberadas (material genético, DNA) pelo micróbio do Calazar, e 1 – 10 mL (1 – 5 colheres de sopa) de sangue coletado na veia para identificar substâncias que o corpo humano produz contra o micróbio (anticorpo) e para pesquisar o DNA do micróbio de Calazar.

Todos os exames serão coletados com material estéril (nunca usados e “sem micróbios”), sendo realizados por profissionais capacitados do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ. O exame na veia não causa nenhum desconforto além da “picada” da agulha que pode algumas vezes causar uma pequena mancha roxa (hematoma) que desaparece em alguns dias sem qualquer tratamento.

Para que participe, o (a) Sr (a) não pode residir ou ter residido em áreas em que ocorram muitos casos das leishmanioses (áreas endêmicas), e também nunca pode ter feito transfusão sanguínea.

Os resultados dos exames (teste imunocromatográfico rK39 e/ou a reação de cadeia de polimerase) aos quais a urina e/ou sangue serão submetidos, serão entregues ao Sr (a). Na dependência do(s) resultado(s) positivo(s), o Sr (a) será encaminhado a uma Unidade hospitalar, para que seja feito o acompanhamento médico adequado.

Se depois de consentir em sua participação o (a) Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhuma forma de prejuízo. O Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração.

A Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) irá conservar, sob sua guarda, qualquer amostra de sangue ou urina para exame de laboratório, até que esta pesquisa seja concluída, e então todo o material será devidamente descartado. Os resultados dos exames, assim como os da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir da pesquisa poderão ser utilizados nas pesquisas futuras.

Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador Rômulo Pessoa e Silva no endereço Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária | Recife/PE – Brasil, pelo telefone (81) 2101-2679.

Consentimento pós-informação

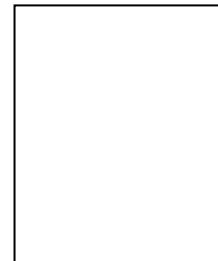
Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Informo também que não resido e nunca residi em áreas de alta ocorrência das leishmanioses, e que também nunca fiz transfusão de sangue. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Recife, ____ de _____ de 20____

Assinatura do participante

Nome: _____

Assinatura e nome do Membro da Equipe de Pesquisa



Impressão do dedo polegar

Caso não saiba assinar

Endereço - Rua (participante) e Telefone



APÊNDICE D - TCLE duplex qPCR
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, ____/____/____

FIOCRUZ

Departamento de Imunologia, CPqAM/FIOCRUZ

APÊNDICE E - Artigo submetido

Artigo submetido na 'PLoS Neglected Tropical Diseases'

Evaluation of the urine as specimen for *Leishmania infantum* DNA detection through real-time qPCR assay

Rômulo Pessoa-e-Silva, Lays Adrienne Mendonça Trajano-Silva, Suênia da Cunha Gonçalves-de-Albuquerque, Rayana Carla Silva de Moraes, Zulma Maria de Medeiros, Maria Almerice Lopes da Silva, Fábio Lopes de Melo, Sinval Pinto Brandão-Filho, Milena de Paiva-Cavalcanti

ABSTRACT

Background: The molecular biology has become increasingly relevant on visceral leishmaniasis (VL) diagnosis as a complement to conventional methods and their limitations, from the development of molecular techniques based mainly on Polymerase Chain Reaction (PCR) and its variants, such as the real-time quantitative PCR (qPCR). The possibility to use noninvasive biological samples has led to a greater interest in applying these techniques, since it can bring comfort and safety to both patients and health professionals. In this context, this work aimed to evaluate the urine as specimen for *Leishmania infantum* kinetoplast DNA detection, through qPCR assay.

Methodology/Principal findings: Four different DNA extraction protocols were evaluated, and after a multifactorial analysis, one of them was chosen to compose the assay. Subsequently to the optimization and reproducibility analysis (with Group 01 or control samples), the qPCR assay was evaluated and compared to routine established reference methods, by percentage agreement and application of the Chi-Square or Fisher's Test. Two Groups were analyzed: 18 patients clinically suspected of having VL (Group 02) and 38 HIV positive patients (Group 03), with or without suggestive renal impairment. The detection limit reached through the chosen protocol was 5 fg (~ 0.034 parasites) per μ L of urine. From the comparative analysis with the set of diagnostic criteria (serological, parasitological and molecular reference tests), and after consider only patients not subjected to anti-*Leishmania* treatment, concordances of 92.10% and 92.31% were obtained for Groups 02 and 03, respectively ($P > 0.05$).

Conclusions: The assay showed good potential to the incorporation, after validation, to the VL diagnosis, bringing comfort, practicality, reliability and quickness to the definitive diagnosis of the pathology, even for clinically heterogeneous groups of patients.

Keywords: Visceral leishmaniasis; diagnosis; real-time quantitative PCR; urine.

INTRODUCTION

The leishmaniasis is a vector-borne disease caused by protozoans of the genus *Leishmania* [1]. It is considered a very important public health problem in several nations of the new and old worlds [2]. According to the World Health Organization [3], 1,3 million of new cases of both cutaneous and visceral forms occur each year, and 310 million people are at risk of infection in 98 countries of five continents. The visceral leishmaniasis (VL) is the most severe clinical form [4], causing approximately 30 thousand deaths annually, a mortality rate surpassed only by malaria [1]. HIV/VL co-infection has been increasingly reported, especially in Southeast Europe and Africa, since the growth of cities has promoted the overlapping of the diseases [5].

The early detection and prompt implementation of treatment, as well as epidemiological elucidation are extremely important for controlling VL, since infected individuals act as reservoirs, contributing to the anthroponotic transmission [6, 7]. In spite of their relevance, conventional diagnostic methods such as direct microscopy and immunological tools have some important limitations, like poor sensitivity and no discrimination between past and current infections, respectively (7-9). In immunocompromised patients (like co-infected HIV/VL), loss of accuracy in serological analysis may occur, and in addition to it, the clinical course of the disease is even less specific and can be masked by other associated opportunistic infections [8, 10].

In this context, molecular methods, like the Polymerase Chain Reaction (PCR) and its variations have been broadly explored to the development of new strategies, aiming to overcome the boundaries in VL diagnosis [11-13]. The real-time quantitative PCR (qPCR) is a technology that brings not only a higher sensitivity and easiness, but also the capacity to estimate parasitological burden in several specimens, like blood and bone marrow aspirate [14, 15]. But despite the numerous samples, some collection procedures bring some risks and discomfort, limiting thus their exploration. This has led to the crescent use of non-invasive specimens, like urine and conjunctival swabs, with good accuracy [16-18]. The filtration of *Leishmania* DNA fragments, or entire parasites through glomerular lesions caused by deposition of immunocomplexes, as well as the presence of the parasite in the urinary tract have allowed the use of urine as sample to detect VL [18-20]. This clinical specimen enables

accessibility, commodity to the patient and also brings more security to the professionals in its manipulation in relation to blood, for example [14, 21].

Herein, we aimed to evaluate the usefulness of the urine as biological sample for the detection of *L. infantum/chagasi* DNA in VL and co-infected HIV/VL patients, using real-time qPCR as diagnostic tool.

MATERIALS AND METHODS

Study design

This is a study of diagnostic method evaluation, based on steps proposed by Sackett and Haynes [22], adapted as follows: I) Reproducibility analysis using known positive and negative samples; II) Analytical sensitivity and specificity analysis; III) Concordance analysis between results of the new test and results obtained by classical tests, using samples from patients.

Patients and groups definition

Blood and urine samples from healthy individuals living in non-endemic areas, never submitted to blood transfusion and negative to immunological and molecular tests were obtained to compose the control group or Group 01. A total of 68 blood and 58 urine samples were collected from 58 patients proceeding from reference hospitals: the Professor Fernando Figueira Integral Medicine Institute (IMIP), Oswaldo Cruz University Hospital – HUOC, Hospital das Clínicas – HC/PE, Barão de Lucena Hospital (HBL) and Correia Picanço Hospital (Pernambuco, Brazil). The Group 02 was composed by 18 patients presenting suggestive VL symptomatology and epidemiological confirmation. The Group 03 included 50 pre-diagnosed HIV/AIDS patients [23] with diverse symptomatology, living or not in endemic areas.

Sample collection and processing

Approximately 50 mL of urine from each subject was collected in sterile tubes containing EDTA (10 mM), and preserved between 4-8°C for subsequent storage at -80°C. A volume of 10 mL of venous blood was also collected from all subjects; 5 mL in tubes containing EDTA (0.009 g/5 mL of blood) for DNA extraction and 5 mL in serum tubes for

antibody research (Vacuette[®], Campinas, SP, BR). All specimens were processed in laboratories belonging to the Aggeu Magalhães Research Center - CPqAM-FIOCRUZ (Recife, PE, BR).

Dilution curves construction

After being thawed to room temperature, urine samples from healthy individuals (Group 01 or control) were subdivided into identical volumes, between 200 and 5,000 μL , for obtaining serial dilutions. Standard genomic DNA from *L. chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) was used for preparation of 10-fold dilution curves, ranging from 5×10^{-3} to 5×10^3 fg of the genetic material ($\sim 3.5 \times 10^{-5}$ to 3.5×10^1 parasites) per μL of urine. These curves were prepared for evaluation of different DNA extraction methods (see below). The standard curve was prepared through 10-fold dilutions, by using the genomic *L. chagasi* DNA, from 1 to 1×10^6 fg/ μL . Ultrapure Milli-Q[®] water was used for dilution. DNA measurement: Nanodrop[®] 2000c (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts).

DNA Extraction from urine and blood

Four protocols were evaluated for DNA extraction from urine: I - Wizard[®] Genomic DNA Purification kit (Promega Corporation, USA), II - QIAamp[®] DNA Mini kit, III - QIAamp[®] Viral RNA Mini kit (QIAGEN Sample and Assay Technologies), following the manufacturer's instructions, and IV – Modified Phenol-Chloroform [24]. Blood samples were extracted through the QIAamp[®] DNA Blood Mini kit (QIAGEN Sample and Assay Technologies), according to the manufacturer's instructions. To improve the detection limit, the first step of the protocol I was modified as follows: 600 μL of cold ethanol (99.5%) was added to 300 μL of the curve's samples (ratio 2:1) and then, centrifuged at $15,700 \times g$, 10 minutes. The supernatant was discarded and the resulting pellets were vortexed during 1 minute. The modification aimed the optimization of the yield, through DNA molecules precipitation, by ethylic substance.

Laboratorial Diagnosis

Serological and molecular tests

Patients from Groups 01, 02 and 03 were submitted to the following reference assays: immunological test, for anti-*Leishmania* antibody detection through ELISA-rK39-ICT (InBios, Seattle, WA, USA), following manufacturer's instructions; and molecular test, based

on qPCR in blood for *L. infantum* kinetoplast DNA (kDNA) minicircle detection, according to Paiva-cavalcanti et al. [25]. The quality assurance of each sample was achieved by mammalian G3PD constitutive gene amplification, employing primers G1F and G1R [26]. Individuals who obtained positivity to one or both tests (set of criteria) were considered infected.

Parasitological test

Parasitological examination (only Group 02) was performed through microscopic evaluation of six slide smears (per patient), prepared from bone marrow aspirate, for amastigotes search [27]. The slides were stained by Giemsa method, and the reading was performed under an optical microscope at 1,000x magnification. The aspirates were obtained by trained physicians, from the respective reference hospitals, only under prescription.

Real-time qPCR optimization in urine

A preliminary assay was performed over the conditions and system (LINF 1B) standardized by Paiva-Cavalcanti et al. [25] to determine the performance of the respective set in urine samples. Three amounts (1×10^5 fg, 1×10^4 fg and 1×10^3 fg, per reaction) of the standard *L. chagasi* DNA (MHOM/BR/1974/PP75) were used for the test. Final volume of reaction: 50 μ L, being 25 μ L of SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) 1x, and 2 μ L of extracted template. A total of 3 pmol of each primer Linf.1-23F (5'-TCCCAAACCTTTTCTGGTCCT-3') and Linf.1-154R (5'-TTACACCAACCCCCAGTTTC-3') was used. All samples were tested in duplicate. The reaction was run for 40 cycles.

Subsequently, four DNA extraction protocols were evaluated, considering their distinct capacities to recover specific quantities of the parasite DNA in urine (detection limit). The curves prepared previously (described above) were employed. The resulting curve of each extraction procedure (the purified DNA) was employed as template. The analysis of the detection limits reached by the set LINF 1B for each procedure was used, together with other properties like cost and easiness (see Table 02), as criteria to choose the most feasible protocol. All samples were tested in duplicate, in the same conditions described for preliminary test.

Efficiency (ε) was calculated according to Too [28], by using the formula: $\varepsilon = (10^{1/\text{slope}}) - 1$. To reach the maximum efficiency, the necessity for modifications in reagent

concentrations and/or in cycling conditions (annealing and extension temperatures) was evaluated.

All experiments were performed including negative controls (sample without DNA and DNA from healthy individuals) and standard curve.

Reproducibility analysis and documentation of results

For reproducibility evaluation, intra and inter-assay analyses were performed. After optimization, the selected protocol was used to extract the DNA from three aliquots of each concentration of the respective dilution curve, prepared in urine samples (as described above). The experiment was then repeated three times. Each concentration was processed in triplicate.

All experiments were performed by using the ABI Prism 7500 (Applied Biosystems[®], CA, USA) equipment. The software ABI Prism 7500 SDS was used for analysis, interpretation and register of results.

Statistical analysis

Urine samples were analyzed by the qPCR assay, and the frequencies of positive and negative results were compared to those from reference tests (set of criteria), (Group 02 and 03) and parasitological test (Group 02); the data were compared by using Chi Square Test for Independence or Fisher's Exact Test, with significance level set at 5% and 1%, respectively. All analyses were performed with the aid of BioEstat 5.0 software [29]. Concordance analysis was performed by descriptive statistic, with absolute and in percentage distribution values.

Ethical considerations

All subjects and/or their legal guardians were invited to sign the Informed Consent before sample collection. This work was submitted and approved by the Research Ethics Committee (CEP/CPqAM/FIOCRUZ-PE, 345.369), in consonance with the National Research Ethics Committee (CONEP-BR).

RESULTS

Sampling

According to the reference tests and criteria previously established, from 18 individuals of different ages belonging to Group 02, 10 (55.55%) were considered positives for VL. Five patients had taken one or more doses of the antileishmanial N-methylglucamine

antimoniato (Glucantime[®]) prior to sample collection. Based on blood levels of urea (U: 10-40 mg/dL) and creatinine (C: 0.60-1.30 mg/dL), suggestive impaired renal function was detected in 01 patient (Table 01).

Table 1. Patients with clinical suspicion of visceral leishmaniasis (Group 02) defined as positives or negatives to VL, and the number of Glucantime[®] doses received before sample collection, as well as presence or absence of raised serum levels of urea and creatinine.

Patient/parasite load (fg)/ Microscopy	Number of doses (Glucantime [®]) (among 10 and 20 mg/ Sb ⁺⁵ /Kg/day)	Raised levels of urea and creatinine (U: 10-40 mg/dl C: 0.60-1.30 mg/dl)
P1 + (133.5)/ M+	2	No
P2 + (*)/ M+	2	No
P3 + (65.09)	0	Yes
P4 + (33.52)/ M-	1	No
P5 + (5,179.5)/ M+	1	No
P6 + (*)/ M+	18	No
P7 + (201.55)	0	No
P8 + (1,867.9)	0	No
P9 + (4.52)	0	No
P10 + (3.27)	0	No
P11 -	-	No
P12 -	-	No
P13 -	-	No
P14 -	-	No
P15 -	-	No
P16 -	-	No
P17 -	-	No
P18 -	-	No

Abbreviations and symbols: P: patients Group 02; (+): positive patients; (-): negative patients, according to the pre-established criteria described in *Laboratorial diagnosis* topic; (*): negative for qPCR in blood; M: positive or negative for parasitological search in bone marrow aspirate by microscopy.

Among the HIV/AIDS positive patients (Group 03), 06 (12.0%) were considered as positives for VL (co-infection), with parasite loads varying from 6.29 to 412.29 fg, and 44 as negatives. Of the total (n = 50), 07 presented elevated levels of U and C; of these, 01 presented as positive for VL. None of the patients from Group 03 received any specific anti-*Leishmania* treatment before sample collection.

Real-time qPCR optimization in urine

The preliminary experiment showed good performance of the set LINF 1B to amplify the *L. chagasi* DNA in urine samples, reaching a good analytical efficiency ($\epsilon = 80.72\%$). The

detection limits obtained with the four extraction protocols are exposed in Table 02. After a multifactorial analysis, the protocol II was chosen for optimization of the qPCR assay in urine.

Table 2. Characteristics of the DNA extraction procedures employed for urine in the visceral leishmaniasis diagnosis by quantitative real time PCR.

DNA extraction procedure *	Laboriousness/ time of processing (01 sample)	Approximated cost US\$ (01 sample)	Detection limit (per μL of sample)	Volume used	Elution volume
I	Moderate/ 2 h 30 min.	1.40	5×10^1 fg	300 μL	100 μL
II	Low/ 1 h	1.90	5 fg	200 μL	200 μL
III	Low/ 1 h	8.60	5 fg	200 μL	60 μL
IV	High/ 2 h 30 min.	1.75	5×10^{-1} fg	5,000 μL	20 μL

* I - Wizard[®] Genomic DNA Purification kit, II - QIAamp[®] DNA Mini kit, III - QIAamp[®] Viral RNA Mini kit, and IV – Modified Phenol-Chloroform [24].

The first reproducibility analysis experiment showed maintenance of the detection limit (5 fg per μL of urine; ~ 0.034 parasites), by using the protocol number II as extraction method. The intra-assay coefficients of variation (CV), calculated from the threshold cycle (C_t) of the triplicates of four different curve concentrations (5 to 5×10^3 fg per μL of urine) were: 1.57%, 3.05%, 4.51% and 1.52%, respectively. The efficiency (ϵ) reached = 93.59%. C_t (5 fg): 31.54 (Figure 01). With the two other reproducibility experiments, inter-assay CV were calculated from the average C_t values of the triplicates from the same four concentrations: 5.90%, 12.99%, 5.12% and 13.99%, respectively. Due to the good detection limit reached, as well as the high degree of reproducibility, it was decided to keep the initial reaction and cycling conditions and consider the assay optimized. The volumes and concentrations of reagents as well as cycling conditions of the real-time qPCR assay continued the same standardized to LINF 1B set, by Paiva-Cavalcanti et al. [25].

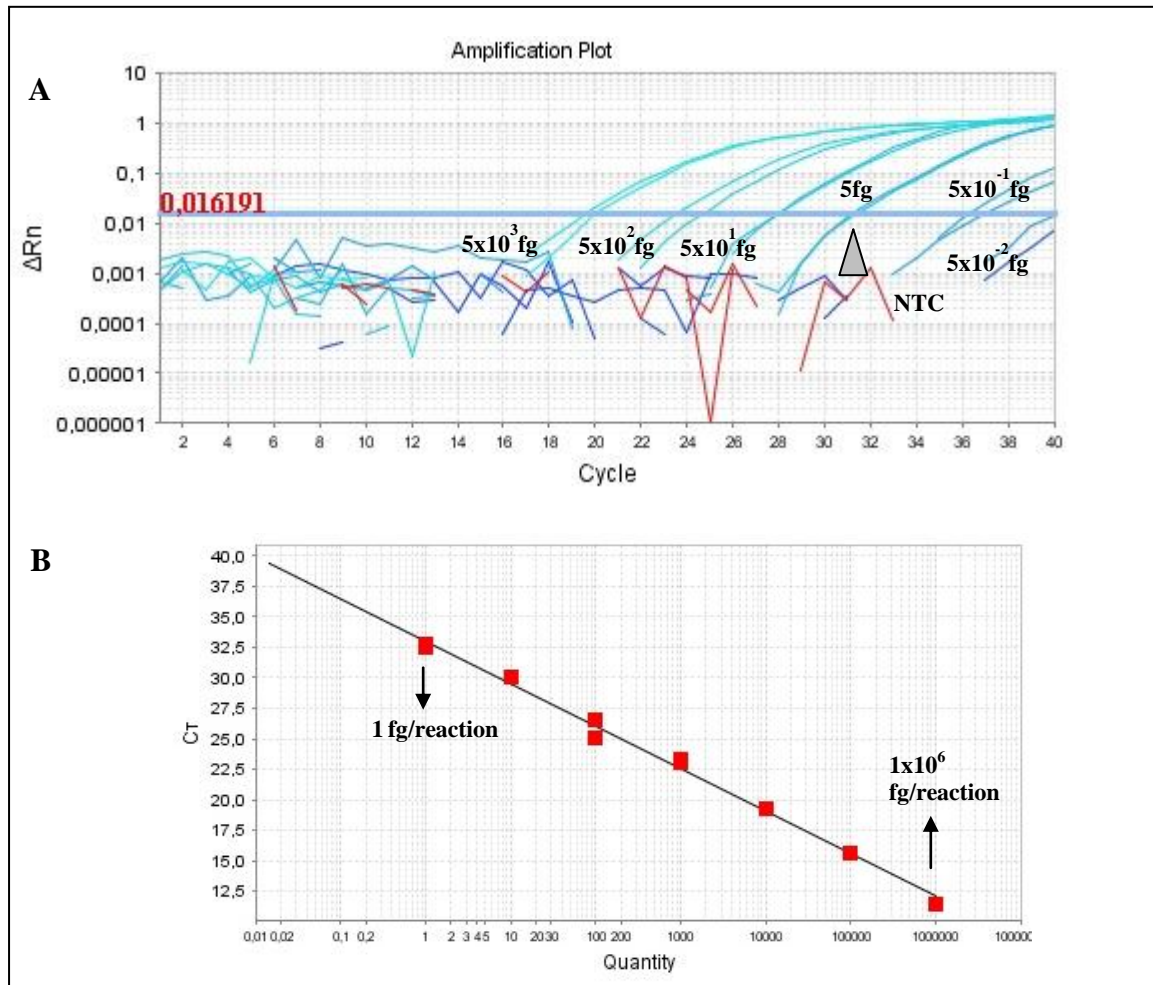


Figure 1. Reproducibility analysis of the qPCR for urine samples. (A) Specimens containing *L. chagasi* DNA (MHOM/BR/1974/PP 75) in concentrations between 5×10^{-3} and 5×10^3 fg/ μ L were extracted using the protocol number II. The detection limit (arrow) of LINF 1B was reproducible (5 fg/ μ L), with a threshold cycle (C_T) = 31.54. NTC: no template control. **(B)** Standard curve of *L. chagasi* DNA (MHOM/BR/1974/PP 75), resulting from the reproducibility analysis. Amounts between 1 and 1×10^6 fg of DNA per reaction (50 μ L) were employed. Analytical efficiency (ϵ) = 93.59%. Slope: -3,683; coefficient of determination (R^2): 0,977.

Statistical analysis

Concordance analysis performed in urine samples from patients belonging to Groups 02 and 03 is exposed in Tables 03 and 04. In the Group 03, urine from 10 patients with severe urinary infection or submitted to hemodialysis was not obtained. Two samples were excluded due to the non-amplification of the quality control (G3PD gene). Thus, 38 samples remained for analysis.

The concordances obtained between the qPCR assay for urine samples and the set of diagnostic criteria were 66.66% and 92.10% to Groups 02 and 03, respectively. For all Groups analyses (separated and together), there were no significant statistical differences between the tests ($P > 0.01$), (Table 03). Excluding from Group 02 the patients who received

before sample collection any dosage of the anti-*Leishmania* drug (Glucantime®), the concordance between the tests increased to 92.31% ($P>0.05$), (Table 04).

Table 3. Concordance analysis between the qPCR assay for urine samples and the set of diagnostic criteria, for VL detection in patients with clinical suspicion (Group 02) as well as in HIV positive patients (Group 03) belonging to reference hospitals from Pernambuco state, Brazil.

Tests	Positive	Negative	N	%
qPCR for urine samples (Group 02)	04	14	18	100
Set of diagnostic criteria ¶	10	08	18	100
Concordance P value *	04	08	12	66,66 0,0505
qPCR for urine samples (Group 03)	02	36	38	100
Set of diagnostic criteria	03	35	38	100
Concordance P value *	01	34	35	92,10 1,000
Global concordance (Groups 02 and 03) P value †	05	42	47	83,93 0.1309

(*): Fisher's Exact Test – P: significance level at 1%; (†): Chi Square Test – P: significance level at 5%; (¶): the set of diagnostic criteria takes into account the results of the serological and molecular reference tests for definition of positivity to VL.

Table 4. Concordance analysis between the qPCR assay for urine samples and the set of diagnostic criteria, for VL detection in patients with clinical suspicion (Group 02) and without anti-*Leishmania* treatment prior to sample collection, belonging to reference hospitals from Pernambuco state, Brazil.

Tests	Positive	Negative	N	%
qPCR for urine samples (Group 02)	04	09	13	100
Set of diagnostic criteria ¶	05	08	13	100
Concordance P value *	04	08	12	92,31 1,000

P: significance level at 1%; (*): Fisher's Exact Test; (¶): the set of diagnostic criteria takes into account the results of the serological and molecular reference tests for definition of positivity to VL.

Bone marrow aspiration was performed only in five from 18 patients from Group 02, and all of them had received one or more doses of the Glucantime[®] (Table 01). A concordance value of 20.0% was obtained (Table 05).

Table 5. Concordance analysis between the qPCR assay for urine samples and the parasitological diagnosis, for VL detection in patients with clinical suspicion (Group 02) belonging to reference hospitals from Pernambuco state, Brazil.

Tests	Positive	Negative	N	%
qPCR for urine samples (Group 02)	0	5	5	100
Parasitological diagnosis (BMA)	4	1	5	100
Concordance	0	1	1	20
P value *				0.0476

P: significance level at 1%; (*): Fisher's Exact Test; MBA: Bone marrow aspiration.

DISCUSSION

Besides all the advantages concerning the molecular biology, one of the most important is the possibility to explore a huge variety of biological samples, including non-invasive ones such as conjunctival swabs and urine. As a consequence of such advantage, many studies have combined the quality of the molecular diagnosis for detecting different pathologies to the comfort and safety to both patient and health professionals, who collect and manipulate the specimens [16, 18].

The presence of genetic material from *Leishmania*, filtered through renal lesions (at glomerular level), as well as the likely presence of amastigotes in the urinary tract [18, 20] enable the exploration of the urine for VL detection in human beings. The use of a highly sensitive tool like real-time qPCR, associated to a highly specific set of primers may contribute to an accurate detection of the parasite's DNA in urine, even in individuals who still present integrity of the renal system; a situation in which the DNA tend to be more scarce. In addition, through the quantification of the genetic material (by qPCR), the estimative of the parasite load becomes possible, enabling thus the monitoring of reactivations and therapeutic efficacy [15], specially important to HIV/VL co-infected patients [18].

The aim of the present study was to evaluate the usefulness of the urine as specimen for detection of kDNA of *L. infantum/chagasi* by qPCR, for VL diagnosis. Urine as biological sample for VL diagnosis in humans has been poorly explored, but with good results [18].

Furthermore, in some routine protocols, due to severity attributed to the disease, the positivity to a immunochromatographic screening test is enough to the establishment of treatment, although the possibility of false-positive results and the high toxicity of available drugs. In this context, the implementation of new molecular tools to a rapid, practical and reliable confirmation of VL becomes pivotal.

For qPCR optimization in urine, the set LINF 1B was evaluated by using dilution curves extracted through different procedures. The lack of standardization among DNA extraction protocols is one of the reasons which hinder the establishment of a gold-standard molecular method to detect not only the VL, but also other infectious and parasitic diseases [8, 30, 31]. Thus, the evaluation of some of the most commonly employed methods and the selection of the best and most feasible, through a multifactorial analysis, becomes a very important step to the development of a reference molecular test.

With the procedure I, set LINF 1B was able to detect 5×10^1 fg of *L. chagasi* DNA per μL of urine, after modifications in the original protocol. Although the low cost per sample, the modifications increased laboriousness and duration (Table 02). In addition, the kit is not targeted to DNA extraction in urine samples, although ensures the removal of some *Taq* Polymerase inhibitors commonly present, like proteins, salts and the Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), [32].

Using the procedure number IV, set LINF 1B was able to detect 5×10^{-1} fg of *L. chagasi* DNA per μL of urine. The large volume of sample used (5 mL) and the small elution volume (20 μL) are partially correlated to the good result. However, it is a very laborious and relatively time consuming method. Also, there is a need to use toxic, easily oxidizable solvents, capable of causing nucleic acid degradation (especially Phenol). Furthermore, it is known by the low reproducibility and increased risk for sample contamination [33]. Even so, is a protocol that allows the removal of inhibitors (suitability), besides having a low cost, approximately US\$: 1.75 [24], (Table 02).

Procedures II and III have similar methodologies. Both share the reduced processing time and practicality for execution (low laboriousness). However, the kits have significant distinct properties: the kit II does not ensure inactivation of unknown qPCR inhibitors which may be present in urine; the kit III assures this inactivation, thanks to the denaturing reagent QiaAmp Viral Lysis (AVL) Buffer [34], presenting, thus, higher suitability to the specimen. On the other hand, its cost per sample is approximately four times higher than the kit II (Table 02).

Therefore, accordingly to these results, and taking into account that urine samples are normally poor in DNA (especially in individuals with healthy renal system) and rich in *Taq* Polymerase inhibitors, the protocol II was chosen to compose the molecular assay: good detection limit (5 fg/ μ L of urine), capacity to inactivate common inhibitors, such as salts, proteins and other contaminants, and the reasonable cost. After the optimization process and reproducibility analysis, the new assay was evaluated through samples belonging to different patient groups: individuals with clinical suspicion of VL and HIV positive patients.

The concordance analysis between the qPCR for urine samples and the set of diagnostic criteria, composed by the serological and molecular reference tests, demonstrated good values, particularly the Group 03 (92.10%). After the exclusion of patients from Group 02 who had received any dose of the Glucantime[®], the concordance value between the tests increased from 66.66% to 92.31% (Tables 3 and 04), demonstrating thus a possible intervention of the drug over the amount of DNA filtered at glomerular level. All patients from Group 02 submitted to parasitological diagnosis had been underwent to treatment; this may justify the low concordance with the technique (20.0%), (Table 05). Fisa et al. [18] used Nested PCR (nPCR) for detection of *L. infantum* DNA in urine samples from patients with or without HIV/VL co-infection. The positivity for patients with clinical episode was 88.0%, while for the treated (Amphotericin B or Glucantime[®], from 1 month to 3 years) was 25.0%. The results indicate that the parasite load as well as the renal lesions tends to reduce after implementation of treatment. Therefore, from our results, the application of the new assay may be targeted for confirmation of individuals with clinical suspicion without beginning of the treatment regimen, and also for monitoring of therapeutic efficacy. However, further studies based in the analysis and monitoring of patients under treatment need to be performed.

HIV positive patients are more susceptible to VL and also to relapses [35], thus, an accurate, comfortable and quantitative diagnosis is essential [36], since serological methods tend to loss the accuracy in immunosuppressed individuals, and do not differentiate reactivations too [7, 37]. In this study, a high co-infection rate was found (12.0%), thus corroborating with the current situation of spread of the diseases [5, 38]. Due to failure to obtain the urine of some HIV+ patients who presented positive to VL, only three co-infected individuals from Group 03 were included to evaluation of concordance between the tests (Table 03). From the analysis and monitoring of a greater number of co-infected patients with and without anti-*Leishmania* therapy, the applicability of the new protocol for recurrences and treatment assessment may be evaluated.

Manna et al. [39] and Solano-Gallego et al. [40] have demonstrated, in animal model (dogs), the relationship between the impairment of renal function and the existence of *Leishmania* DNA in urine. Nevertheless, in the present study, among the four VL positive individuals from Group 02 who had not received treatment, just one (P3 - Table 01) presented elevated serum levels of U and C (suggesting renal insufficiency). Hence, the tool was capable to detect genetic material of *L. infantum* in urine samples even from patients without renal lesion, possibly due to filtration, at glomerular level, of DNA fragments from the etiological agent [41, 42]. In Group 03, only one positive patient (qPCR in blood - 54.95 fg) presented high levels of U and C; nonetheless, the patient showed negative to qPCR in urine; whereas another positive patient with normal U and C presented positive to qPCR in urine.

Comparative analyses of Groups 02 and 03 (separately and together) showed no significant statistical differences with the set of diagnostic criteria ($P > 0.01$), thereby reinforcing the potential applicability of the molecular assay in urine samples, to an accurate and practical VL diagnosis, for the situations already described (Table 03).

CONCLUSION

The real-time qPCR protocol was employed for detection of *L. infantum* DNA in urine samples, showing good and promising results for the inclusion into the definitive diagnosis of VL, acting as a comfortable, practical and fast diagnostic complement to routine conventional techniques and their limitations, even for clinically heterogeneous groups of patients. With a larger number of VL and HIV/VL individuals before and during treatment, the usefulness for monitoring of relapses and therapy efficacy can also be assessed, thus bringing an important approach for the investigation of disease progression. The applicability of the molecular assay will be precisely determined after the validation process, through evaluation of sensitivity, specificity and efficiency indicators. Then, with this work we hope to bring not only the enhancement for the molecular diagnosis, but also benefits for patients, health professionals and for the population as a whole, since the early and accurate detection of reservoirs favor reduction of VL incidence.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Nara Gualberto Cavalcanti from Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP, Recife-Pernambuco, for providing samples from some VL patients, as well as the results of the parasitological exam. The authors also thank Elis

Dionísio da Silva, from CPqAM/FIOCRUZ, for helping to supply samples from HIV positive patients. Thanks to the Program of Technological Development in Health Supplies (PDTIS/FIOCRUZ) for allowing us to use its facilities, and to the State of Pernambuco Research Foundation (FACEPE), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/PAPES VI, the Ministry of Health, the Secretary of State for Health (SES/PE) and Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM)/FIOCRUZ, for financial and structural support.

REFERENCES

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, et al. (2012) WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE, 10(5): e35671.
2. Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, et al. (2008) Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis in Europe. Emerg Infect Dis 14: 1013-1018.
3. World Health Organization, WHO, (2014a). Leishmaniasis. Available: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> Accessed 06 November 2014.
4. Noazin S, Modabber F, Khamesipour A, Smith PG, Moulton LH, et al. (2008) First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. Vaccine 26: 6759-6767.
5. World Health Organization, WHO (2014b) African Health Observatory. Available: http://www.aho.afro.who.int/profiles_infor_mation/i_ndex.php/AFRO:Leishmaniasis/pt Accessed: 07 March 2014.
6. Khan MGM, Bhaskar KR, Salam MA, Akther T, Pluschke G, et al. (2012) Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. Parasit Vectors 5: 280-287.
7. 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.
8. Cota GF, de Sousa MR, Demarqui FN, Rabello A (2012) The Diagnostic Accuracy of Serologic and Molecular Methods for Detecting Visceral Leishmaniasis in HIV Infected Patients: Meta-Analysis. PLoS Negl Trop Dis 6(5): e1665.
9. Sundar S, Rai M (2002) Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol 9: 951-958.
10. Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez MI, Laguna F, et al. (1997) *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. Clin Microbiol Rev 10: 298-319.

11. da Silva MAL, Pedrosa Soares CR, Medeiros RA, Medeiros Z, de Melo FL (2013) Optimization of single-tube nested PCR for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol* 134: 206-210.
12. 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(4): e19304.
13. Pandey K, Pandey BD, Mallik AK, Kaneko O, Uemura H, et al. (2010) Diagnosis of visceral leishmaniasis by polymerase chain reaction of DNA extracted from Giemsa's solution-stained slides. *Parasitol Res* 107: 727-730.
14. Ferreira SdA, Almeida GG, Silva SdO, Vogas GP, Fujiwara RT, et al. (2013) Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Negl Trop Dis* 7(4): e2150.
15. dos Santos Marques LH, Gomes LI, da Rocha ICM, da Silva TAM, Oliveira E, et al. (2012) Low Parasite Load Estimated by qPCR in a Cohort of Children Living in Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 6(12): e1955.
16. Galai Y, Chabchoub N, Ben-Abid M, Ben-Abda I, Ben-Alaya-Bouafif N, et al. (2011) Diagnosis of Mediterranean Visceral Leishmaniasis by Detection of *Leishmania* Antibodies and *Leishmania* DNA in Oral Fluid Samples Collected Using an Oracol Device. *J Clin Microbiol* 49: 3150-3153.
17. Vaish M, Mehrotra S, Chakravarty J, Sundar S (2011) Noninvasive Molecular Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 49: 2003-2005.
18. Fisa R, Riera C, López-Chejade P, Molina I, Gállego M, et al. (2008) *Leishmania infantum* DNA Detection in Urine from Patients with Visceral Leishmaniasis and after Treatment Control. *Am J Trop Med Hyg* 78: 741-744.
19. Abeijon C, Campos-Neto A (2013) Potential Non-invasive Urine-Based Antigen (Protein) Detection Assay to Diagnose Active Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 7(5): e2161.
20. Salgado Filho N, Ferreira, Telma MAFF, Costa, JML (2003) Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 217-221.
21. Reis LES, Coura-Vital W, Roatt BM, Bouillet LEM, Ker HG, et al. (2013) Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Vet par* 197: 498-503.
22. Sackett DL, Haynes RB (2002) Evidence base of clinical diagnosis: The architecture of diagnostic research. *BMJ journals* 324: 539-541.

23. Brasil (2013) Secretariat of Health Surveillance. Department of epidemiologic surveillance. Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV. Brasília-DF: Ministry of Health, 55p.
24. da Silva MAL Medeiros Z, Soares CRP, da Silva ED, Miranda-Filho, DB, et al. (2014) A comparison of four DNA extraction protocols for the analysis of urine from patients with visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 47: 193-197.
25. Paiva-Cavalcanti M, Felinto de Brito ME, de Souza WV, de Miranda Gomes Y, Abath FG (2009) The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* in canine blood. *Vet J* 182: 356-358.
26. 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* 18: 188-197.
27. BRASIL (2014) Secretariat of Health Surveillance. Department of epidemiologic surveillance. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília-DF: Ministry of Health. 120p.
28. Too HP (2003) Real Time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. *Mol Brain Res* 114: 146-154.
29. Ayres M, Junior MA, Ayres DL, Santos, AS, Ayres LL (2007) BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Sociedade Civil Mamirauá: Belém. 364p.
30. Cruz I, Millet A, Carrillo E, Chenik M, Salotra P, et al. (2013) An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. *Exp Parasitol* 134: 281-289.
31. Rocha LS, dos Santos CB, Falqueto A, Grimaldi G Jr, Cupolillo E (2010) Molecular biological identification of monoxenous trypanosomatids and *Leishmania* from antropophilic sand flies (Diptera: Psychodidae) in Southeast Brazil. *Parasitol Res* 107: 465-468.
32. Promega (2012) Wizard® Genomic DNA Purification Kit: Instructions for use of Product. Wisconsin, Madison - USA, 2012. 20 p.
33. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, et al. (2011) International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *PLoS Negl Trop Dis* 5(1): e931.
34. Qiagen (2010) Sample and Assay Technologies. QIAamp® Viral RNA Mini Handbook, 3 ed. 44p. Available: <http://www.qiagen.com/br/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en>. Accessed 13 May 2013.
35. World Health Organization, WHO (2014c) Leishmaniasis: burden and distribution: Leishmaniasis and HIV coinfection. Available:

http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/.
Accessed 09 November 2014.

36. Motazedian M, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam G, Mikaeili F (2008) A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Diagn Micr Infec Dis* 60: 151-154.
37. Desjeux P, Alvar J, 2003. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 97: 3-15.
38. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, et al. (2008) The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *J Clin Microbiol* 21: 334-359.
39. Manna L, Reale S, Picillo E, Vitale F, Gravino AE (2008) Urine sampling for real-time polymerase chain reaction-based diagnosis of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest* 20: 64-67.
40. Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, et al. (2007) Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet Par* 147: 315-319.
41. Franceschi A, Merildi V, Guidi G, Mancianti F (2007) Occurrence of *Leishmania* DNA In Urines of Dogs Naturally Infected with Leishmaniasis. *Vet Res Commun* 31: 335-341.
42. Su YH, Wang M, Brenner DE, Ng A, Melkonyan H, et al. (2004) Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-size, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer. *J Mol Diagn* 6: 101-107.

APÊNDICE F - Artigo publicado 1

Revista 'Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases'

Gonçalves-de-Albuquerque et al. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2014, **20**:16
<http://www.jvat.org/content/20/1/16>



RESEARCH

Open Access

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

Suênia da Cunha Gonçalves-de-Albuquerque, Rômulo Pessoa e Silva, Rayana Carla Silva de Morais, Lays Adrienne Mendonça Trajano-Silva, Carlos Gustavo Régis-da-Silva, Sinval Pinto Brandão-Filho and Milena de Paiva-Cavalcanti*

Abstract

Background: Molecular biological 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 a 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: Two primer pairs were designed to detect the plasmid pUC18 and a triplex PCR assay targeting the *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA, the external control and the internal control was standardized. The triplex PCR assay was assessed for its ability to detect 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 optimized with the chosen external control system (P1) allowed the simultaneous detection of the internal control (G3PD – 567 bp) as well as of small quantities (10 pg) of the target parasite's DNA, detected by amplification of a 138 bp product.

Conclusions: The new tool standardized herein enables a more reliable interpretation of PCR results, mainly by contributing to 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. braziliensis* kDNA.

Keywords: Extraction control, Multiplex PCR, pUC18, Leishmaniasis, Diagnosis, False-negative result

Background

Methods in molecular biology have become extremely 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 sample processing time and elimination of the need for culturing [2,3]. As a result, medical and veterinary diagnostic tools 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 the 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

* Correspondence: mp@cpqam.fiocruz.br
 Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Recife, Pernambuco CEP 50670-420, Brasil



the identification of parasites to the species level, the evaluation of sample integrity and also PCR performance on pools of phlebotomine sandflies [8-12].

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. 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 of reliability due to poor sample quality. 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 not only ensuring the high quality of each individual sample, but also assessing 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 essential. 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 common 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, thus enabling a 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 by targeting an external control (a commercial

plasmid), an internal control (a housekeeping gene) and the target parasite's DNA (*L. braziliensis* kinetoplast DNA).

Compared to the traditional PCR protocols, the protocol presented herein allows a better interpretation of PCR results and promote quality assurance of the leishmaniasis diagnosis. The cost-benefit ratio is improved by ensuring the quality of results sample-by-sample, along with the simultaneous detection of *Leishmania* spp. Performing three PCRs in one mixing saves reagents, which makes it a rational decision for repeating reactions. Additionally, this method may be adapted for the molecular diagnosis of any infectious disease, providing fast results with a small margin of error.

Methods

Blood samples and controls

Human and canine blood samples were collected from one healthy person and two healthy dogs and used as controls. These samples were used to produce known negative and positive controls for the optimization tests. Informed consent was obtained from the dogs' owners and the person included in the study, and all procedures were approved by the Research Ethics Committee (CEP-FIOCRUZ/PE, 42/2010) and by the Ethics Committee for Animal Use (CEUA-FIOCRUZ/RJ, LW-41/10 and LW-1/11) of our institution. As positive controls, a blood sample from a healthy dog and one from the human were spiked with genomic DNA of *L. 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 five basic 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 (P1-P1f: 5'-GTAATAGCG AAGAGGCC-3'; P1r: 5'-TAAGAAACCATTATTATC-3' and P2-P2f: 5'-TTGTACTGAGAGTGAC-3'; P2r: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') 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 ten-fold serial dilutions (from 50 ng/μL to 0.5 fg/μL) of pUC18. Concentrations between 1 and 20 μM of the forward (P_f) and reverse (P_r) 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 whereas each primer (P_f and P_r) was added to the mACL master mix, containing the primers previously designed [7] for internal control detection (G1_f: 5'-ATCTTCCAGGAGCGAGATCCC-3'; G2_r: 5'-CTGCTTACCACCTTCTTGAT-3'). The primers kDNA_f (5'-ATGCCTCTGGGTAGGGGCGTTC-3') and kDNA_r (5'-GGGAGCGCGCCCACTATATT-3'), designated as kDNA1 system, were designed by our research group to detect the conserved region of the *L. braziliensis* kDNA. The standardization process was performed by analyzing the results of the interactions among the systems P_f/P_r, 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

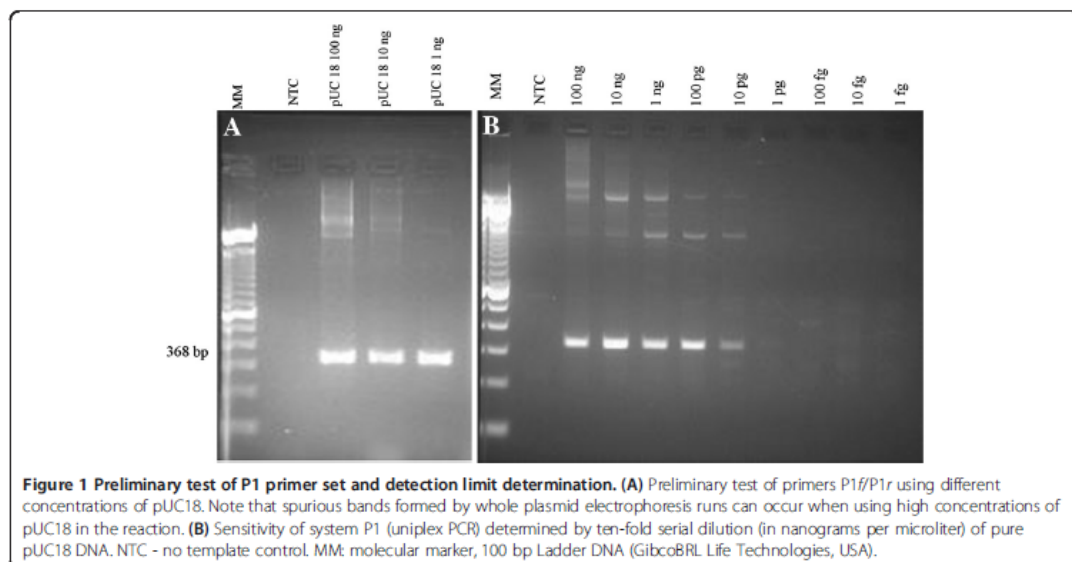
To evaluate the specificity of the primers in a triplex PCR format, a sample containing the three targets (*L. braziliensis*, G3PD gene, and pUC18) was subjected to PCR amplification by the three primer sets (kDNA1, G3PD and P1) separately, under standardized conditions. The PCR products obtained by 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 the molecular marker. Gel pictures were taken using a 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'-TTGTACTGAGAGTGAC-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 1 – A), 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 a concentration as low as 5 pg/μL (total of 10 pg per reaction mixture) as shown in Figure 1 – B. The lowest amount of primers that held this sensitivity (10 μM of each of them) was chosen to compose the first triplex PCR trials.

The observation of competition among primer pairs and target templates indicated a necessity to modify some conditions of mACL and P1 standardized initially. Simultaneous amplification of 10 pg per reaction pUC18, G3PD, and *L. 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 kDNA1/kDNA1r1, 5 μM of each primer G1F/G2R, 20 μM of each primer P1/P1r, 10 U of *Taq* polymerase and 2 μL of DNA template.

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 to G3PD, the highest homology (75%) was found with a sequence of a human x-linked GAPD pseudogene [GenBank: X01111.1]. The kDNA1 product presented 94% similarity to a sequence of *L. 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 suggest a method to track possible causes of false-negative results in microbiological diagnosis by PCR, requiring minimal technical training. The triplex PCR assay proposed herein 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 the 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 P1 in 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 DNA reporter. Indeed, the P1 system gave reproducible results during the optimization process in *L. braziliensis*-negative samples, being helpful in diagnosis interpretation and thus

achieving the proposed aim. Even minimal losses of genetic material may affect significantly the detection of the parasite's DNA, which is often found in small quantities, leading to incorrect diagnostic conclusions. As a recognized limitation, high molecular weight bands could be observed in agarosis gels, representing excess and/or folding of pUC 18 plasmid in the samples. However, the appearance of these bands does not confuse the interpretation of the results, as the amplicon size of each system is well known and was demonstrated by sequence analysis to be specific.

Against this background, this new tool provides a more reliable interpretation of the PCR results, as shown in Table 1, especially by virtue of contributing to 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 while maintaining the detection limit (18 parasites per reaction), previously obtained with the mACL duplex system [7]. The simultaneous amplification of three different targets may interfere in the detection limit of PCR as compared with simplex PCR protocols, which may be able to detect minimal amounts of the parasite's DNA [21]. The main advantage of the triplex assay presented herein is the amplification of three different targets to ensure the quality of the result. The analysis of DNA sequences showed no cross-amplification among 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, thereby 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 are based on the pUC18 sequence and 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 are leading to an overall reduction of costs, making PCR-based methods more accessible [22,23]. As 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 attributable to many factors, 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

Table 1 Interpretation and actions suggested after observation of different positivity combinations of the quality controls and *Leishmania* spp. main target in the triplex PCR reaction

Result/PCR target positivity	Interpretation/meaning	Action
G3PD 567 bp (+) pUC 316 bp (+) <i>L. braziliensis</i> 138 bp (+)	Valid results for parasite diagnosis	Conclude diagnostic test observation
G3PD 567 bp (+) pUC 316 bp (-) <i>L. braziliensis</i> 138 bp (+)	Valid results for parasite diagnosis despite small loss of DNA in extraction	Conclude diagnostic test observation
G3PD 567 bp (-) pUC 316 bp (+) <i>L. braziliensis</i> 138 bp (+)	Valid results for parasite diagnosis despite small degradation of sample	Conclude diagnostic test observation
G3PD 567 bp (-) pUC 316 bp (-) <i>L. braziliensis</i> 138 bp (-)	Degradation of DNA sample/presence of PCR inhibitors and/or whole DNA loss during extraction	Repeat diagnostic procedure since the blood sample collection
G3PD 567 bp (-) pUC 316 bp (+) <i>L. braziliensis</i> 138 bp (-)	Degradation of DNA sample before extraction	Repeat diagnostic procedure since the blood sample collection
G3PD 567 bp (+) pUC 316 bp (-) <i>L. braziliensis</i> 138 bp (-)	Significant DNA loss (affecting mainly parasite genome) during extraction process	Repeat the DNA extraction procedure
G3PD 567 bp (+) pUC 316 bp (+) <i>L. braziliensis</i> 138 bp (-)	True negative result for <i>Leishmania</i> detection assured by the positivity of quality controls	Conclude diagnostic test observation

in samples, constitutive genes have been used in parallel assays to assess the integrity of the DNA template [7,15]. To improve the cost-benefit ratio and to shorten the time consumed by this evaluation, we recently proposed a duplex PCR assay capable of detecting a housekeeping gene as an endogenous control [7]. Nevertheless, samples from patients with low parasite burden may contain minimal amounts of a parasite's DNA, which may be even more profoundly 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 demonstrated with various types of clinical samples [24-28]. 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, the fact that the *L. braziliensis* kDNA amplicon presented homology in relation to kDNA regions of

other *Viannia* species suggests that the primers and protocols reported in the study may be used directly or adapted for the detection of several species of these parasites.

Conclusions

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. braziliensis* kDNA. To the best of our knowledge, no similar method has been applied to the molecular diagnosis of parasitic diseases using blood samples. An interesting insight of our group is the comparative analysis of the single PCR to the new triplex PCR protocol to maintain high diagnosis accuracy. This method may be applied to the molecular diagnosis of any infectious disease, providing quicker results with minimal margin of error.

Ethics committee approval

The present study was approved by the Ethics Committee for Animal Use (CEUA- FIOCRUZ/RJ, LW-41/10 and LW-1/11) of Oswaldo Cruz Foundation.

Consent

Informed consent was obtained from the dogs' owners and the person included in the study. Moreover, all procedures were approved by the Research Ethics Committee of Oswaldo Cruz Foundation (CEP-FIOCRUZ/PE, 42/2010).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MPC is the lead researcher of this study. MPC, SCGA and RPS designed the study. MPC and CGRS designed primers and gave intellectual support for this work. RPS, RSCM, LAMTS and SCGA performed experiments and their analysis. SCGA carried out the molecular genetic studies, analyzed amplicon sequencing and drafted the manuscript. SPBF and all authors read and approved the final version of this manuscript.

Acknowledgments

Thanks to the Program of Technological Development in Health Supplies (PDTIS/Fiocruz) for allowing us to use its facilities, and to the State of Pernambuco Research Foundation (FACEPE), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/PAPES VI and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for financial support.

Received: 17 October 2013 Accepted: 7 April 2014

Published: 22 April 2014

References

- Schallig HDFH, Oskam L: Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Int Health* 2002, **7**(8):641-651.
- Ogram AV, Saylor GS: The use of gene probes in the rapid analysis of natural microbial communities. *J Ind Microbiol* 1988, **3**(5):281-292.
- Tsai YL, Olson BH: Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl Environ Microbiol* 1991, **57**(4):1070-1074.
- Frank E: Funding the public health response to terrorism. *BMJ* 2005, **331**:378-379.
- Akhavan AA, Mirhend H, Khamesipour A, Alimohammadian MH, Rassi Y, Bates P, Kamhawi S, Valenzuela JG, Arandian MH, Abdoli H, Jalali-zand N, Jafari R, Shareghi N, Ghanei M, Yaghoobi-Ershadi MR: *Leishmania* species: detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. *Exp Parasitol* 2010, **126**(4):552-556.
- 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):537-542 [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S16789199201000040004&script=sci_abstract]
- Gonçalves SC, Régis-da-Silva CG, Brito MEFC, 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**(2):188-197 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992012000200009]
- Harris E, Kropp G, Belli A, Rodríguez B, Agabian N: Single-Step multiplex PCR assay for characterization of new world *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol* 1998, **36**(7):1989-1995.
- Jorquera A, González R, Marchán-Marciano 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):45-48.
- Rodríguez-González I, Marín C, Longoni SS, Mateo H, Alunda JM, Minaya G, Gutiérrez-Sánchez R, Vargas F, Sánchez-Moreno M: Identification of New World *Leishmania* species from Peru by biochemical techniques and multiplex PCR assay. *FEMS Microbiol Lett* 2007, **267**(1):9-16.
- 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):66-69.
- Oliveira DM, Reinhold-Castro KR, Bernal MV, Legriffon CM, Lonardoni MV, Teodoro U, Silveira TG: Natural infection of *Nyssomyia névai* by *Leishmania (Vannia)* spp. in the state of Paraná, southern Brazil, detected by multiplex polymerase chain reaction. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011, **11**(2):137-143.
- Giltsbach 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):173-177.
- Solano-Gallego L, Rodríguez-Cortes A, Trotta M, Zamperon C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J: Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Ver Parasitol* 2007, **147**(3-4):315-319.
- Castilho TM, Camargo LM, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM: A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Trop Med Hyg* 2008, **78**(1):122-132.
- 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**(2):259-268.
- Alm EW, Zheng D, Raskin L: The presence of humic substances and DNA in RNA extracts affects hybridization results. *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**(10):4547-4554.
- 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**(10):4859-4862.
- 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**(2):92-96.
- 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**(3):299-306.
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presler W, Jaffe CL: PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003, **47**(1):349-358.
- Livengood CH 3rd, 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**(8):2928-2932.
- 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):337-348.
- Reiss RA, Rutz B: Quality control PCR: a method for detecting inhibitors of Taq DNA polymerase. *Biotechniques* 1999, **27**(5):920-926.
- 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):387-392.
- 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):92-99.
- 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):110-119.
- Leblanc-Maridor M, Garénaux A, Beaudeau F, Chidaïne B, Seegers H, Denis M, Belloc C: 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.

doi:10.1186/1678-9199-20-16

Cite this article as: Gonçalves-de-Albuquerque et al.: Tracking false-negative results in molecular diagnosis: proposal of a triplex-PCR based method for leishmaniasis diagnosis. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2014 **20**:16.

APÊNDICE G - Artigo publicado 2

Revista 'Molecular Biotechnology'

Mol Biotechnol
DOI 10.1007/s12033-014-9825-2

RESEARCH

Inclusion of Quality Controls on Leishmaniasis Molecular Tests to Increase Diagnostic Accuracy in Research and Reference Laboratories

Suênia da C. Gonçalves-de-Albuquerque · Rômulo Pessoa-e-Silva ·
Lays A. M. Trajano-Silva · Rayana C. S. de Moraes ·
Sinval P. Brandão-Filho · Milena de Paiva-Cavalcanti

© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Early detection of leishmaniasis and prompt institution of treatment are paramount for individuals and communities affected by these diseases. To overcome the remaining limitations inherent to molecular methods currently used and to ensure the accuracy of results in leishmaniasis diagnosis, two triplex polymerase chain reaction (PCR) assays with quality controls for the reactions were developed. Validity indicators were assessed in 186 dog blood samples from endemic areas in Brazil. The level of agreement between the new tools and their singleplex protocols was assessed by kappa analysis. The triplex PCR for visceral leishmaniasis showed sensitivity (S) = 78.68 %, specificity (E) = 85.29 %, and efficiency (e) = 81.05 %. The cutaneous leishmaniasis protocol showed S = 97.29 %, E = 79.16 %, and e = 90.16 %. Both protocols showed good agreement with gold standards. 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 a second sample.

Keywords Leishmaniasis · Diagnosis · Multiplex PCR · PCR inhibitors · Quality controls

Introduction

Neglected tropical diseases 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 [1–3]. 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 [4]. 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) [5].

Nonetheless, parasitologic and serologic methods for leishmaniasis diagnosis have some limitations [6]. The limitations inherent to the microscopy and immunology-based assays have spurred parasitologists toward the use of more refined molecular tools [7]. Besides the conventional PCR, other PCR-based methods have been recently implemented for the detection of several parasitic infections [8–10]. The use of molecular diagnostic techniques has shown that PCR can achieve “gold standard” criteria, in some instances [11].

The PCR limitations related to the evaluation of the quality of samples and DNA extraction procedures may cause false-negative results, when compared with

S. da C. Gonçalves-de-Albuquerque · R. Pessoa-e-Silva ·
L. A. M. Trajano-Silva · R. C. S. de Moraes ·
S. P. Brandão-Filho · M. de Paiva-Cavalcanti (✉)
Department of Immunology, Aggeu Magalhães Research Center,
Oswaldo Cruz Foundation, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Recife,
Pernambuco 50670-420, Brazil
e-mail: mp@cpqam.fiocruz.br; milena.cavalcanti@bol.com.br

S. da C. Gonçalves-de-Albuquerque
e-mail: sueniaaa@hotmail.com

R. Pessoa-e-Silva
e-mail: romulops3@hotmail.com

L. A. M. Trajano-Silva
e-mail: laystrajano@gmail.com

R. C. S. de Moraes
e-mail: rayanacarla_m@hotmail.com

S. P. Brandão-Filho
e-mail: sinval@cpqam.fiocruz.br

Published online: 27 November 2014

 Springer

conventional parasitological methods [12]. Indeed, the results of studies aimed at developing PCR assays [13] 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. The inclusion of the EC may demonstrate losses due to low efficiency of extraction process. 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 are leading to the overall reduction of costs, making PCR-based methods more accessible for their application in laboratory routines [14]. The union of different targets in the same reactions reduces the cost of reagents, since the PCR components used are shared among the detection systems. 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 [8, 10] were used as negative controls in the optimization (human samples) and validation (dogs samples) steps [15]. Samples known to be positive were obtained by the addition of genomic DNA from *Leishmania infantum* (MHOM/TN/1980/IPT1) or *Leishmania 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 consenting their participation, and a parent or guardian of

any child participant signed for them. 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 three steps (cell lysis, washing out impurities, and elution of the DNA). For the optimization of triplex PCR reactions, the external control (EC) 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* or *L. braziliensis* detection [8, 10], respectively, were optimized for conventional PCR. These detection systems are able to be applied widely in different geographical areas where species of complex *Donovani* [8] and subgenus *Viannia* [10] are endemic.

Internal Control (IC)

The amplification of mammalian *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (G3PD) gene was chosen as IC to determine DNA degradation and PCR inhibitors present in the blood samples [13].

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 internal transcribed spacer-1 (ITS-1) 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 [16].

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 or CL, retaining the reaction

and cycling conditions standardized by Gonçalves and co-workers [13]. To optimize the simultaneous detection of the three targets, when necessary, changes were made to the melting temperature and concentration of reagents. Table 1 summarizes the settings of the two reactions optimized for the amplification of *L. infantum* or *L. braziliensis* and the two quality controls. The detection limits of the EC and of the aetiological agents in the triplex reactions were determined by the addition of a tenfold serial dilution (from 0.1 fg to 1 ng) of genomic DNA of *M. pachydermatis* and *L. infantum* or *L. 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

The results of uniplex PCR and qPCR (positives in at least one of the techniques; negatives in both techniques) using LINF1B [8] or kDNA1 [10] primers were taken as gold standards. Results of the new tests were compared to the

Table 1 Features of the two triplex PCR protocols developed for visceral (tVL) and cutaneous (tCL) leishmaniasis diagnosis including IC and EC in the same reactions

Target (Ref.)	Primers (5'-3')	Size (bp)	tVL	tCL	Reaction and cycling conditions	
					tVL	tCL
IC [13]	<i>f</i> : ATC TTC CAG GAG CGA GAT CCC <i>r</i> : ATC AAG AAG GTG GTG AAG CAG	567	+	+	25 µL PCR mix: 20 mM Tris; 50 mM KCl; 3 mM MgCl ₂ ; 0.2 mM each dNTP; 0.04 µM each IC primer; 0.2 µM each EC primer; 0.2 µM each <i>Li</i> primer; 5 U Taq polymerase; 2 µL template DNA	25 µL PCR mix: 20 mM Tris; 50 mM KCl; 3 mM MgCl ₂ ; 0.4 mM each dNTP; 0.2 µM each IC primer; 0.4 µM each EC primer; 0.24 µM each <i>Lb</i> primer; 5 U Taq polymerase; 2 µL template DNA
EC [23]	<i>f</i> : AGG TTT CCG TAG GTG AAC CT <i>r</i> : TTC GCT GCGT TCT TCA TCG A	282	+	+	94 °C/30 s	94 °C/30 s
<i>Li</i> [15]	<i>f</i> : TCC CAA ACT TTT CTG GTC CT <i>r</i> : TTA CAC CAA CCC CCA GTT TC	132	+	-	60.3 °C/1 min	63 °C/1 min
<i>Lb</i> [17]	<i>f</i> : ATG CCT CTG GGT AGG GGC GTT C <i>r</i> : GGG AGC GCG GCC CAC TAT ATT	138	-	+	72 °C/1 min 35 cycles	72 °C/1 min 35 cycles

Li *Leishmania infantum*, *Lb* *Leishmania braziliensis*, bp base pairs

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 2×2 contingency tables, and the following formulae: $S = TP / TP + FN$; $E = TN / TN + FP$; and $e = TP + TN / n$ [17].

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 [18]. 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. braziliensis* kDNA simultaneously with EC and IC (Fig. 1). 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. braziliensis* targets was 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. 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. Accepting the results of the samples on which IC or EC were not detected,

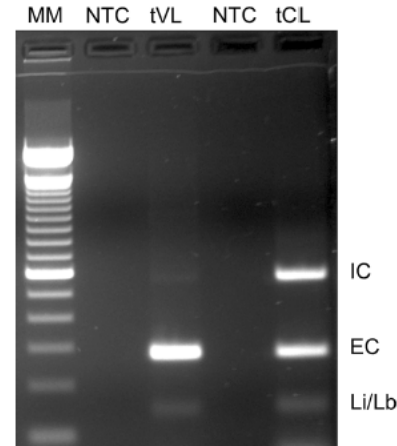


Fig. 1 Triplex PCR assays optimized for simultaneous detection of *L. infantum* (tVL: 1 fg of *Li* and 10 pg of EC) or *L. braziliensis* (tCL: 10 pg of *Lb* and 100 fg of EC), internal control (IC), and external control (EC). Molecular marker (MM): product size was determined using 100 bp DNA Ladder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

the tVL obtained $S = 78.68 \%$, $E = 86.48 \%$, and $e = 81.63 \%$ while for tCL was $S = 78.26 \%$, $E = 88.09 \%$, and $e = 82.95 \%$, compared with the gold standard. Eliminating the samples in which IC and/or EC were PCR negative (15.05 %), 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 *Leishmania* positivity of the 186 samples tested on each protocol (singleplex PCR and qPCR and triplex PCRs) is shown on Table 2. The positivities for each target on the 98 and 88 samples tested by tVL and tCL, respectively, are shown in Fig. 2.

Results obtained by tVL showed good agreement ($k = 0.62$, $p < 0.0001$) with the gold standard. Eliminating the samples with inhibitors and those in which DNA was lost, 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 samples unsuitable for diagnosis 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, using external and IC to determine losses of DNA during the extraction process or degradation during storage. Indeed,

the use of IC has been proven very important to assess sample quality [13], 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 [19, 20].

In developing countries, the use of PCR is still limited for economic reasons [21], mainly for the diagnosis of neglected diseases such as leishmaniasis. In spite of the development of very advanced molecular tools, the practical and economic difficulties in the implementation at the public health level bring some negative impact on their effectiveness. Therefore, it has been suggested the implementation of DNA-based diagnostic tools such as PCR as quality controls, for example, of rapid diagnostic tests (RDTs) for *Leishmania*, by extracting the DNA from used RDTs [22], constituting an important and reliable tool to the surveillance of laboratory traditional methods.

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. [21]). Among the 41 true *L. braziliensis*-positive samples, 27 (65.8 %) did not show EC amplification. This result occurred in samples with a high parasite load, which probably led to early consumption of reagents favoring *Leishmania* DNA amplification to the detriment of EC, as previously shown [23].

The tCL assay demonstrated reproducibility in *L. 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. 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.

Table 2 *Leishmania* positivity for three PCR protocols applied in the 186 dog blood samples from endemic areas in Brazil for validation of the tVL and tCL

	LINF 1B PCR	LINF 1B qPCR	tVL
VL diagnosis			
Positives	49	61	53
Negatives	49	37	45
	kDNA1 PCR	kDNA1 qPCR	tCL
CL diagnosis			
Positives	45	46	41
Negatives	43	42	47

In this context, these new tools allow a better interpretation of PCR results and promote quality assurance of leishmaniasis diagnosis.

One of the positive aspects of our triplex PCR is that 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. In fact, adding two new primer pairs in the diagnostic reactions does not influence significantly the whole price per reaction, due to the low cost of each primer synthesis and the very low concentrations used (between 0.04 and 0.4 μ M).

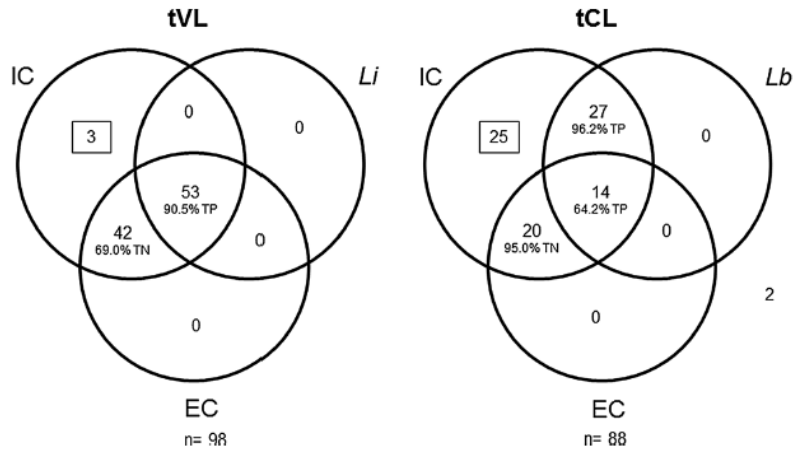
A "gold standard" is defined as the method that provides unambiguous results. Its use is a necessary prerequisite to examine the usefulness of any diagnostic test [11, 17]. In this context and considering the absence of methods comparable to PCR in terms of accuracy, the own uniplex formats of each assay herein developed were chosen as relative standards, about which the concordance and validity index were calculated.

For CL diagnosis, different sensitivities and specificities 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) [24]. The kDNA PCR is considered to be the most sensitive method for diagnosing leishmaniasis since there are $\sim 10,000$ minicircles per parasite [25] and is, therefore, useful for diagnostic procedures. In contrast with the protocols evaluated by Benoussan and co-workers [24], 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 [26], for the uniplex B1/B2 PCR, which is widely used in research laboratories in Brazil. Marcussi and co-workers [27] presented the LBF1/LBR1 primers for identification of *L. 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 [28] developed a duplex PCR for *L. donovani* complex with a 4.7 fg detection limit, which is better than the limit reached by our tVL assay that has, however, one additional target sequence (EC).

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

Fig. 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



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.

Conclusion

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/or CL are endemic, by offering a fast and accurate tool to confirm cases of these expanding, neglected diseases.

Acknowledgments We appreciate Claudia Cafarchiás help by sending the *M. pachydermatis* material from the Department of Veterinary Medicine, University of Bari, Italy; and Luciana Aguiar Figueredo, Filipe Dantas-Torres, and Domenico Otranto by the scientific opinion. Thanks to the Program of Technological Development in Health Supplies (PDTIS/FIOCRUZ) for allowing us to use its facilities, and to the State of Pernambuco Research Foundation (FACEPE), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/PAPES VI and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for financial support.

Conflicts of interest The authors declare no conflicts of interest in this publication.

References

1. Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., et al. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7, e35671.

2. Hotez, P. J., & Brown, A. S. (2009). Neglected tropical disease vaccines. *Biologicals*, 37, 160–164.

3. Hotez, P. J., Molyneux, D. H., Fenwick, A., Kumaresan, J., Ehrlich, S. S., Jeffrey, D., et al. (2007). Control of neglected tropical diseases. *New England Journal of Medicine*, 357, 1018–1027.

4. Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., et al. (2007). Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, 5, 873–882.

5. Ashford, R. W. (2000). The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30, 1269–1281.

6. Ikononopoulos, J., Kokotas, S., Gazouli, M., Zavras, A., Stoit-siou, M., & Gorgoulis, V. G. (2003). Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Veterinary Parasitology*, 113, 99–113.

7. Ndao, M. (2009). Diagnosis of parasitic diseases: Old and new approaches. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. e278246.

8. Paiva-Cavalcanti, M., Brito, M. E. F., Souza, W. V., Gomes, Y. M., & Abath, F. G. C. (2009). The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* in canine blood. *Veterinary Journal*, 182, 356–358.

9. Basuni, M. (2011). A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84, 338–343.

10. Paiva-Cavalcanti, M., Dantas-Torres, F., Gonçalves-de-Albuquerque, S. C., Morais, R. C. S., Brito, M. E., Otranto, D., & Brandão-Filho, S. P. (2013). Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. *Molecular and Cellular Probes*, 27, 122–128.

11. Rodríguez-Cortés, A. (2010). *Leishmania* infection: Laboratory diagnosing in the absence of a “gold standard”. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82, 251–256.

12. Miranda, A., Saldaña, A., González, K., Paz, M., Santamaría, G., Samudio, F., & Calzada, J. E. (2012). Evolution of PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis and species identification using filter paper samples in Panama, Central America. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106, 544–548.

13. Gonçalves, S. C., Régis-da-Silva, C. G., Brito, M. E. F. C., Brandão-Filho, S. P., & Paiva-Cavalcanti, M. (2012). Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of leishmaniasis. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *18*, 188–197.
14. Yang, S., & Rothman, R. E. (2004). PCR-based diagnostics for infectious diseases: Uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet Infectious Diseases*, *4*, 337–348.
15. Sackett, D. L., & Haynes, R. B. (2007). Evidence base of clinical diagnosis: The architecture of diagnostic research. *BMJ*, *324*, 539–541.
16. Cafarchia, C., Stefania, L. M., Testini, G., Parisi, A., Guillot, J., Gasser, R. B., & Otranto, D. (2007). Molecular characterization of *Malassezia* isolates from dogs using three distinct genetic markers for nuclear DNA. *Molecular and Cellular Probes*, *21*, 229–238.
17. World Organization for Animal Health (OIE). (2010). *Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases* (pp. 1–18). Paris: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals OIE.
18. Rosner, B. (2006). *Fundamentals of Biostatistics* (6th ed.). Boston: Duxbury Press.
19. Mumy, K. L., & Findlay, R. H. (2004). Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative-competitive PCR. *Journal of Microbiological Methods*, *57*, 259–268.
20. Alm, E. W., Zheng, D., & Raskin, L. (2000). The presence of humic substances and DNA in RNA extracts affects hybridization results. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*, 4547–4554.
21. Elfrino, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., & Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews*, *13*, 559–570.
22. Pandey, K., Pandey, B. D., Mallik, A. K., Acharya, J., Kato, K., Kaneko, O., & Ferreira, P. E. (2014). A new molecular surveillance system for leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *90*(6), 1082–1086.
23. Polz, M. F., & Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multi-template PCR. *Applied Environment Microbiology*, *64*, 3724–3730.
24. Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L. F., & Jaffe, C. L. (2006). Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*, 1435–1439.
25. Disch, J., Pedras, M. J., Orsini, M., Pirmez, C., Oliveira, M. C., Castro, M., & Rabello, A. (2005). *Leishmania* (*Viannia*) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *51*, 185–190.
26. Brujin, M., & Barker, D. C. (1992). Diagnosis of New World leishmaniasis: Specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica*, *52*, 45–58.
27. Marcussi, V. M., Marcussi, L. M., Barbosa-Tessmann, I. P., Lonardon, M. V. C., & Silveira, T. G. V. (2008). *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: New primers for identification using polymerase chain reaction. *Experimental Parasitology*, *120*, 300–305.
28. Dish, J., Carligiome, R. B., Marciel, F., Oliveira, M. C., Orsini, M., Dias-Neto, E., & Rabello, A. (2006). Single-step duplex kDNA-PCR for detection of *Leishmania donovani* complex in human peripheral blood samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *56*, 395–400.

APÊNDICE H - E-book pré aceito

E-mail de pré aceite (Bentham Science Publishers):

Abstract Acceptance : eBook Entitled 'Tropical Diseases: Immunological and Molecular Tools Applied to the Epidemiology and Control' [Dr. Cavalcanti, Ref. No. 21-01-14-EBK1//EOI-35]

August 21, 2014

Dear Dr. Cavalcanti,

I am very pleased to inform you that we have received positive review reports from neutral referees and our review board for your proposed e-book entitled '*Tropical diseases: immunological and molecular tools applied to the epidemiology and control*'

You may view the author's guideline at <http://ebooks.benthamscience.com/manuscript-organization.php> that will help you in the eBook preparation. I have also enclosed the **sample chapter** which will assist you to prepare the chapters as per our format.

Please note that we require all non-native English speaking contributors to have the eBook /chapter checked and certified by native English speakers for language and grammar. If you will be involving other contributors to contribute chapters in the book, you are kindly advised to engage eminent scientist largely from technologically advanced countries to contribute various chapters.

Before submitting your ebook, use the **enclosed Checklist** to make sure you have taken care of all the particulars and confirm that your book is complete and ready for submission.

In case if you need any assistance you may contact me, I will be pleased to help you in all my capacities.

Sincerely!

Humaira Hashmi
In-charge eBook Department
Editorial Manager Publications
Bentham Science Publishers
UR: <http://ebooks.benthamscience.com/>

Resumo E-book:

Tropical Diseases: Immunological and Molecular Tools Applied to the Epidemiology and Control, 2015,

CHAPTER 1

Diagnosis of the trypanosomiasis

Rômulo P. Silva^{1,2}, Lays A. M. Trajano-Silva¹, Marina A. Souza¹, Beatriz C. Oliveira¹, Andresa P. O. Mendes¹, Valéria R. A. Pereira¹, Milena P. Cavalcanti¹

¹*Aggeu Magalhães Research Center, CPqAM/FIOCRUZ – PE, Recife, Pernambuco, Brazil;* ²*Central Laboratory of Public Health Dr. Milton Bezerra Sobral*

Abstract: The Trypanosomatidae family is composed by protozoan parasites responsible for causing a variety of human and non-human diseases, of varying gravities, in both new and old worlds. The distribution and adaptation of the trypanosomatids in tropical and subtropical countries, as well as the usual habitats of vectors commonly favour contamination of poor neglected populations, despite the increasing expansion to peri-urban and urban areas, thus reaching other social and economic realities. Illnesses like leishmaniasis and American trypanosomiasis (or Chagas disease) share the fact that both have a great diversity of reservoirs associated to the cycle of the parasites, which includes synanthropic mammals and the *Homo sapiens* itself. Therefore, to an efficient epidemiological control, the continuous search for new human cases, as well as the monitoring and controlling of infected animals is fundamental. The laboratorial techniques routinely used for detection of these diseases may vary from simple parasitological analysis to cutting-edge molecular technology. Due to its easiness and diagnostic sensitivity, the immunology/serology is broadly applied in the laboratories and also in field, even with its limitations. The molecular biology and its tools are emerging as sensitive and specific alternative strategies for the trypanosomiasis diagnosis, but some challenges still remain, especially concerning the standardization of protocols and the establishment of gold-standard procedures. New serological and molecular methods arise annually aiming to overlap deficiencies that may reduce the feasibility for applying in routine and in epidemiological researches. In this chapter, the past and current diagnostic situation of leishmaniases, Chagas disease and Human African trypanosomiasis (HAT) or “sleeping sickness” will be described, highlighting the technological advances and the difficulties to be faced for the next years, mainly regarding the applicability for public health.

Keywords: Leishmaniases, American Trypanosomiasis, African Trypanosomiasis, Diagnosis.

ANEXO A - Parecer Comitê de Ética em Pesquisa



Título do Projeto: “Avaliação da técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico da leishmaniose visceral em amostras de urina”.

Pesquisador responsável: Rômulo Pessoa e Silva.

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 19/02/2013

Registro no CAAE: 13422213.3.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 345.369

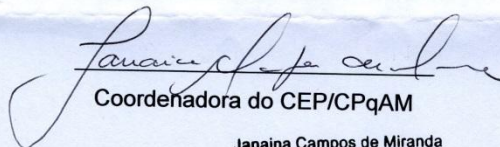
PARECER

O Comitê avaliou 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 17 de julho de 2016.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 06 de fevereiro de 2014.


Coordenadora do CEP/CPqAM

Janaina Campos de Miranda
Pesquisadora em Saúde Pública
Coordenadora
Mat. SIAPE 464777
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@cpqam.fiocruz.br



ANEXO B - Parecer Comitê de Ética em Pesquisa: duplex qPCR



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 formulação 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.

Milena Cavalcanti Gouveia
 Milena Cavalcanti Gouveia
 Farmacóloga
 Coordenadora
 CEP/CPqAM/Fiocruz

Observação:

Anexos:

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

ANEXO C - Parecer de Relatório Parcial/renovação CEP: duplex qPCR



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

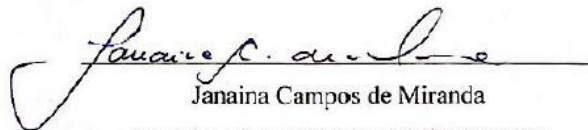
Registro no CAAE: 0041.0.095.000-10

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



Generated by CamScanner