

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Curso de Doutorado em Saúde Pública

Maria Almerice Lopes da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS BASEADOS EM NESTED-PCR
CONVENCIONAL E EM ÚNICO TUBO PARA O DIAGNÓSTICO DE
LEISHMANIOSE VISCERAL.**

RECIFE

2012

MARIA ALMERICE LOPES DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS BASEADOS EM NESTED-PCR
CONVENCIONAL E EM ÚNICO TUBO PARA O DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE
VISCERAL.

Tese apresentada ao Curso de Doutorado
do Programa de Pós-Graduação em Saúde
Pública do Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para
a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadores: Dra. Zulma Medeiros
Dr. Fábio Lopes de Melo

Recife
2012

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

S586d Silva, Maria Almerice Lopes da.

Desenvolvimento de sistemas baseados em Nested-PCR convencional e em único tubo para o diagnóstico de leishmaniose visceral./ Maria Almerice Lopes da Silva. — Recife: Autora, 2012.

99 f.: il.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

Orientadores: Zulma Medeiros, Fábio Lopes de Melo.

1. Leishmaniose Visceral - diagnóstico. 2. Reação em Cadeia da Polimerase. 3. Técnicas de Diagnóstico. I. Medeiros, Zulma. II. Melo, Fábio Lopes de. III. Título.

CDU 616.993.161

MARIA ALMERICE LOPES DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS BASEADOS EM NESTED-PCR
CONVENCIONAL E EM ÚNICO TUBO PARA O DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE
VISCERAL.

Tese apresentada ao Curso de Doutorado
do Programa de Pós-Graduação em Saúde
Pública do Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para
a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Milena de Paiva Cavalcanti
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Leucio Camara Alves
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Zulma Medeiros
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

“Que darei eu ao SENHOR, por todos os benefícios que me tem feito?” (Salmos 116.12).
Obrigada, Deus! Sem o Senhor, eu não estaria aqui.

Aos meus pais, Fátima e Luiz Carlos, por toda dedicação, amor, investimento, confiança para eu chegar aonde cheguei, e aos meus irmãos, Adriana e Lucar pela confiança.

Ao meu esposo Saulo, companheiro e participante em tudo, e a minha filha, Ana, meu amor incondicional.

À Rita, Karla, Jorge, Débora e Khátia pelas orações e momentos de descontrações.

Aos meus orientadores, Dra. Zulma Medeiros e Dr. Fábio Melo por todo conhecimento compartilhado, paciência e, principalmente, pela amizade.

A Cynthia Regina, nossa aluna PIBIC, que sempre se mostrou dedicada a esse projeto.

Aos meus companheiros de trabalho do Laboratório de Doenças Transmissíveis e do Serviço de Referência Nacional em Filarioses do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, que não só torceram por mim, mas também jogaram juntos comigo para essa conquista.

À chefia do Departamento de Parasitologia e à direção do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela permissão a mim concedida para realização desse objetivo profissional.

A Gilvan Mariano, pela criatividade gráfica, e George Tadeu, pelas análises estatísticas, meu muito obrigada.

Aos meus amigos que estão comigo desde o começo dessa caminhada, que assistiram todas as minhas conquistas até chegar aqui, e que através de suas orações criaram um ambiente favorável para conclusão do meu trabalho.

"Confia no Deus eterno de todo o seu coração e não se apoie na sua própria inteligência. Lembre-se de Deus em tudo o que fizer, e ele lhe mostrará o caminho certo."
(Provérbio 3:5-6)

SILVA, Maria Almerice Lopes da. **Desenvolvimento de sistemas baseados em nested-PCR convencional e em único tubo para o diagnóstico de leishmaniose visceral.** 2012. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

RESUMO

A leishmaniose visceral ocorre em países dos cinco continentes e quando não tratada pode levar a óbito. Para se evitar esse desfecho, são essenciais o diagnóstico precoce e tratamento adequado. Com o objetivo de contribuir na pesquisa de novos diagnósticos para leishmaniose visceral, esse trabalho propôs desenvolver sistemas baseados em Nested-PCR convencional e em único tubo para o diagnóstico de leishmaniose visceral. A partir de uma revisão na literatura em busca de alvos moleculares utilizados no diagnóstico dessa parasitose, foram selecionados os alvos subunidade menor do RNA ribossômico (ssu rRNA) e espaçador transcrito interno 1 (ITS-1), que compõem o DNA do agente etiológico *Leishmania infantum*, para o desenvolvimento das nested-PCR. Foi também escolhido o alvo kDNA, o mais aplicado nas abordagens de PCR, para comparações com os sistemas desenvolvidos. Após otimizar todas as PCR com DNA genômico de *L. infantum*, esses sistemas foram avaliados em amostras de sangue, soro e urina de indivíduos com suspeita de leishmaniose visceral dos hospitais de referência da cidade do Recife – PE. Para utilização da urina, foram avaliados quatro protocolos de extração de DNA e identificou-se que a extração por fenol-clorofórmio, com modificações, foi a de melhor desempenho. Na avaliação com amostras biológicas, as PCR simples e nested-PCR com os alvos ssu rRNA e ITS-1 não tiveram boa sensibilidade ao se usar sangue, e não foram capazes de amplificar DNA do parasito em soro e urina. Esses sistemas desenvolvidos não podem ser usados para o diagnóstico da leishmaniose visceral. No entanto, a kDNAPCR apresentou bons resultados quando avaliada com urina. Mais estudos devem ser feitos para avaliá-la como um diagnóstico seguro para esse tipo de amostra biológica. Esse trabalho representa um ponto de início para posteriores estudos que objetivem o aprimoramento e validação da nested-PCR único tubo para o diagnóstico da leishmaniose visceral.

Palavras-chaves: Leishmaniose visceral, Reação em Cadeia da Polimerase.

SILVA, Maria Almerice Lopes da. **Development systems based on nested-PCR and conventional single tube for the diagnosis of visceral leishmaniasis.** 2012. Thesis (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis occurs in countries across five continents and when untreated can lead to death. Early diagnosis and adequate treatment are essential to prevent this outcome. With the aim of contribute to the research of new diagnostic tools for visceral leishmaniasis, this thesis proposed the development of systems based on conventional and a single tube nested-PCR in for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. As from a review in search of molecular targets used for diagnosing this disease, the targets subunit ribosomal RNA (ssu rRNA) and internal transcribed spacer-1 (ITS-1) were selected for the development of nested-PCR. Those targets form the DNA of the *Leishmania infantum* that is etiological agent. It was also chosen the target kDNA, the most applied in PCR approaches, to compare with the systems developed. All PCR were evaluated in samples of blood, serum and urine of subjects with suspected to visceral leishmaniasis of the reference hospitals in Recife - PE. Four protocols were evaluated for use urine as a source of DNA. The phenol-chloroform extraction, with modifications, showed the best performance. In the evaluation of biological samples, the simple PCR and nested-PCR using targets ssu rRNA and ITS-1 did not have good sensitivity when using blood, and were not able to amplify DNA from *L. infantum* in serum and urine. These systems developed can not be used for diagnosis of visceral leishmaniasis. However, kDNAPCR showed good results when evaluated with urine. More studies should be conducted to evaluate it as a safe diagnosis for this type of biological sample. This work represents a starting point for future studies that aim at the improvement and validation of single tube nested-PCR for the diagnosis of visceral leishmaniasis.

Key words: Visceral leishmaniasis, Polymerase Chain Reaction, diagnostic.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 1 - | Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Velho e no Novo Mundo. | 15 |
| Figura 2 - | Áreas de maior concentração de casos de leishmaniose visceral. | 16 |
| Figura 3 - | Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp. | 18 |
| Figura 4 - | Criança com leishmaniose visceral na fase aguda, apresentando hepatoesplenomegalia. | 21 |
| Figura 5 - | Etapas que compõem a amplificação de alvos na cadeia de DNA pela PCR. | 25 |
| Figura 6 - | Esquema da STNPCR. | 28 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|---|
| AIDS | Acquired Immune Deficiency Syndrome |
| CPqAM | Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães |
| DAT | Direct Agglutination Test |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| rDNA | DNA ribossomal |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| ICT | Imunochromatography Test |
| IFI | Imunofluorescência Indireta |
| ITS | Internal Transcribed Spacer |
| kDNA | Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto |
| MS | Ministério da Saúde |
| NNN | Neal, Novy, Nicole |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| OPAS | Organização Pan-Americana da Saúde |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PKDL | Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| ssu rRNA | Subunidade do RNA ribossomal |
| SFM | Sistema fagocítico mononuclear |
| SINAM | Sistema de Informação de Agravos e Notificações |
| STNPCR | Single Tube Nested PCR |
| SVS | Secretaria de Vigilância em Saúde |
| Syn | Sinonímia |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral | 14 |
| 2.2 Agente etiológico: ciclo biológico e transmissão | 18 |
| 2.3 Diagnóstico da leishmaniose visceral | 20 |
| 2.3.1 Diagnóstico clínico-epidemiológico | 20 |
| 2.3.2 Diagnóstico parasitológico | 21 |
| 2.3.3 Diagnóstico Imunológico | 22 |
| 2.3.4 Diagnóstico Molecular – Polymerase chain reaction (PCR) | 24 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 29 |
| 4 HIPÓTESE | 30 |
| 5 OBJETIVOS | 31 |
| 5.1 Objetivo geral | 31 |
| 5.2 Objetivos específicos | 31 |
| 6 ARTIGOS | 32 |
| 6.1 Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. | 33 |
| 6.2 Optimization of single-tube nested PCR for diagnosing visceral leishmaniasis. | 47 |
| 6.3 A comparison of four DNA extraction protocols for analysis of urine from patients with visceral leishmaniasis | 57 |
| 6.4 Avaliação de três alvos moleculares para o diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue, soro e urina. | 71 |
| 7 CONCLUSÃO | 82 |
| REFERÊNCIAS | 83 |
| APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para menor de idade | 90 |
| APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para adulto | 93 |
| ANEXO A – Parecer de aprovação do projeto pelo Comitê De Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães | 96 |
| ANEXO B – Parecer de aprovação do artigo 1 da pela Revista Eletrônica | |

| | |
|---|-----------|
| de Farmácia | 97 |
| ANEXO C – Cópia do e-mail da submissão do artigo 2 | 98 |
| ANEXO D – Cópia do e-mail da submissão do artigo 3 | 99 |

1 INTRODUÇÃO

A expansão da leishmaniose visceral pelos cinco continentes nas últimas décadas tem trazido a reflexão sobre a reavaliação das estratégias dos programas de controle. Como controlar e/ou eliminar uma doença que se mantém em um ciclo de transmissão complexo, onde um dos principais reservatórios está no domicílio, o cão doméstico, ou, em alguns lugares, a fonte de infecção para o vetor é o homem? Além do mais, não há uma forma de diagnóstico “ouro” para detecção de casos, que em sua maioria é assintomática. Uma certeza se tem: que as medidas de controle aplicadas de formas isoladas não são efetivas para a redução do surgimento de novos casos.

Sob um olhar de ação integrada das medidas de controle a leishmaniose visceral, é indiscutível a importância do diagnóstico precoce, que favorece a identificação do caso e o tratamento adequado do indivíduo. Porém, após um século desde a descoberta do parasito responsável pela doença, os serviços de saúde ainda não dispõem de uma ferramenta laboratorial sensível e eficaz, que apresente segurança nos resultados obtidos. O que se tem como “padrão ouro” é o diagnóstico parasitológico, de coleta invasiva e de difícil aplicação nos estudos de campo. Ou, ainda, dispõe-se dos ensaios imunológicos, que apesar de serem mais fácil de executar em relação ao parasitológico, apresentam deficiências em relação à certeza de seus resultados e variação de acordo com a população-alvo.

Dentro desse contexto, muitas pesquisas foram desenvolvidas nas últimas décadas e apontam a utilização da PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) como uma promissora ferramenta para o diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral, devido aos bons resultados de sensibilidade e especificidade e sua versatilidade em poder ser aplicada em diversos fluidos. Com o objetivo de contribuir com essas pesquisas, esse trabalho propôs desenvolver sistemas baseados em PCR, trazendo uma nova proposta de metodologia que é a aplicação da nested-PCR em único tubo. Ao fim do trabalho, quatro artigos foram escritos, dos quais o artigo 1 já foi publicado, o artigo 2 e o artigo 3 foram submetidos para publicação.

No primeiro artigo, foi realizada uma revisão com as publicações sobre PCR aplicada ao diagnóstico da leishmaniose visceral, com o intuito de sistematizar informações sobre alvos e iniciadores já descritos para o diagnóstico da leishmaniose visceral. No artigo 2 estão descritos os resultados dos ensaios laboratoriais para a otimização das PCR simples, para então padronizar a nested-PCR convencional e, a seguir, a nested-PCR em único tubo. O artigo 3 traz a avaliação de quatro protocolos de extração de DNA em urina, enquanto no

artigo 4 estão os resultados dos sistemas desenvolvidos nesse trabalho quando aplicados as amostras biológicas sangue, soro e urina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesse capítulo será apresentada uma breve revisão sobre os objetos de estudo da presente tese, apontando os principais aspectos da epidemiologia, transmissão e diagnóstico da leishmaniose visceral, enfatizando a aplicação do diagnóstico molecular como uma importante ferramenta de diagnóstico da doença.

2.1 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral

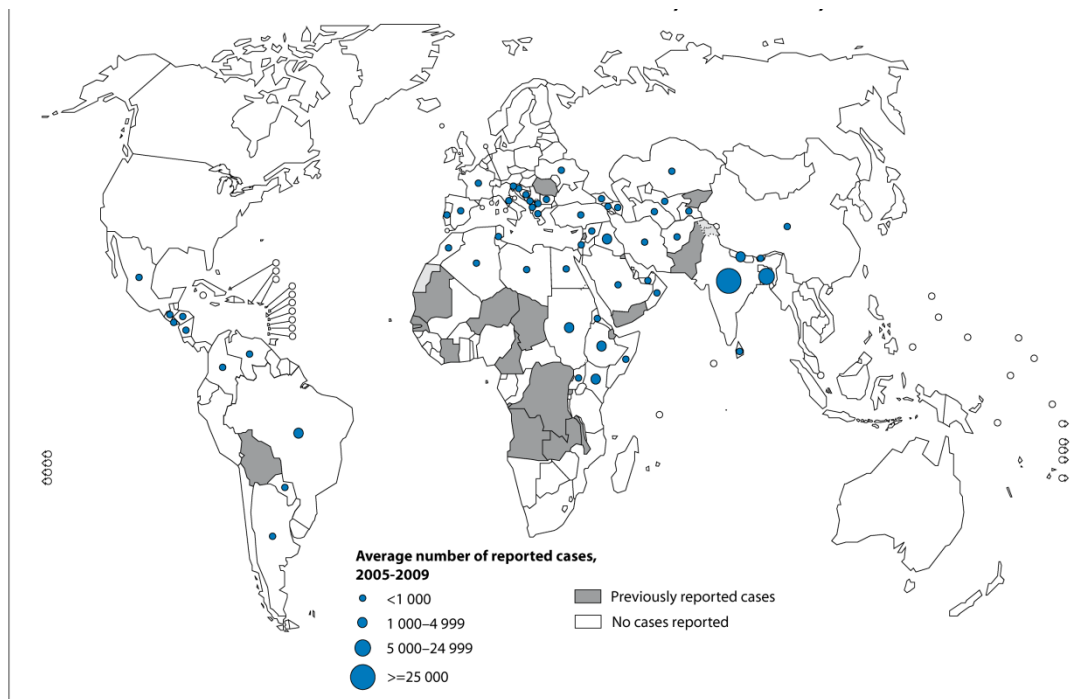
As leishmanioses são um grupo de infecções causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, que pertencem à ordem Kinetoplastida e à Família Trypanosomatidae. Dependendo do tropismo desses parasitos, a doença pode se apresentar em quatro formas: leishmaniose cutânea, mucocutânea, visceral e post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). Os fatores que definem o tipo de manifestação clínica são inerentes às espécies infectantes e a saúde e constituição genética e imune do hospedeiro (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007; LOCKSLEY et al., 1999). Nas suas diversas formas afetam populações de cerca de 90 países (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012). Em documento apresentado após a 60ª Assembleia Mundial de Saúde, as leishmanioses foram apontadas como uma das doenças tropicais mais negligenciadas e estima-se que esse grupo de doenças é responsável por cerca de 2,34 milhões de incapacidades por ano em todo mundo (WORLD HEALTH ASSEMBLY, 2010).

A leishmaniose visceral é uma zoonose com várias formas de transmissão já descritas. Em países da América do Sul, como o Brasil, a doença é transmitida pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas e o cão doméstico (*Canis familiaris*) é o principal reservatório, enquanto raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) e outros animais silvestres desempenham um importante papel na transmissão silvestre (ROMERO; BOELAEART, 2010). Outras formas de transmissão da doença, onde não há envolvimento de um reservatório animal, é a forma congênita, transfusional, através de transplantes de órgãos (ANTINORI et al., 2008) e pelo compartilhamento de agulhas/seringas contaminadas para uso de drogas ilícitas injetáveis. Esta última vem sendo a principal forma de transmissão da leishmaniose visceral em países do Mediterrâneo (ALVAR et al., 2008; CRUZ et al., 2006). Na Índia, o ciclo de transmissão é através da antroponose, ocorrendo de forma direta pessoa a pessoa no momento do repasto sanguíneo da fêmea infectada do *Phlebotomo argentipes* (BORA, 1999). A doença é endêmica em 98 países ou territórios dos cinco continentes, com 350 milhões de

peças vivendo em risco, 500.000 novos casos descritos anualmente, dos quais 90% estão concentrados na Índia, Sudão, Bangladesh e Brasil. Cerca de 50.000 mortes por ano são atribuídas à leishmaniose visceral (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010a) (Figura 1).

As espécies responsáveis pela infecção são parasitos do complexo *Leishmania donovani*, que são a *L. donovani* e a *L. infantum*, dependendo da região geográfica. O status da espécie *L. chagasi* está sob discussão, pois se concluiu que no Novo Mundo, essa espécie é a mesma que *L. infantum*, sendo identificada por *L. infantum* (syn. *L. chagasi*). Outra espécie pertencente a esse complexo seria a *L. archibaldi*, encontrada na África Oriental (MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2004; MAURÍCIO et al., 2006). Porém, estudos utilizando análise de isoenzimas e outros marcadores moleculares apontam que essa espécie é inválida e que se trata da *L. donovani* (JAMJOOM et al., 2004; LUKES et al., 2007). Esses parasitos são protozoários intracelulares obrigatórios que se apresentam em duas formas: amastigota (em vertebrados, forma aflagelada) e promastigota (tubo digestivo dos vetores invertebrados, forma flagelada) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010a).

Figura 1. Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Velho e no Novo Mundo, 2009.



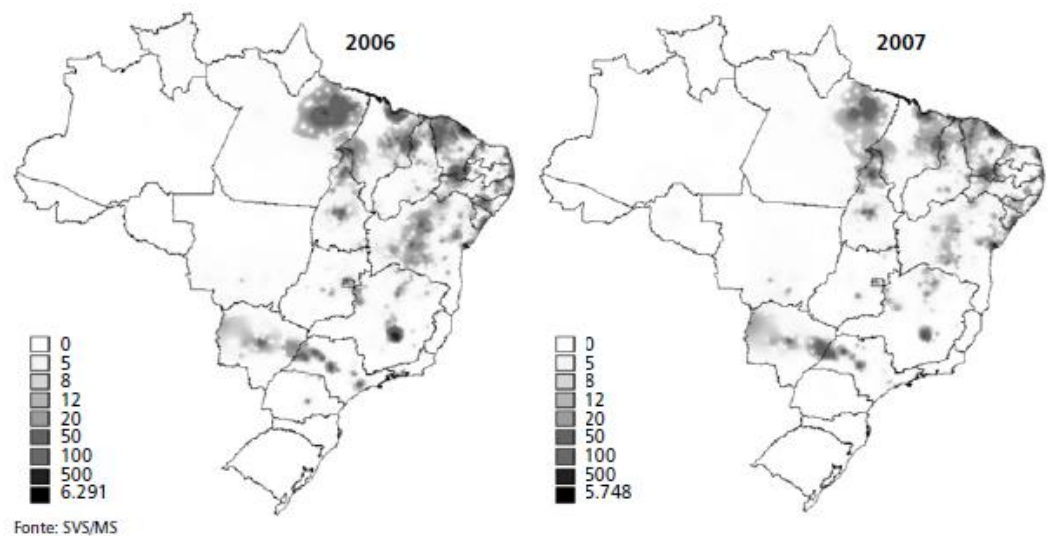
Fonte: Organização Mundial de Saúde (2010c).

No Brasil, a doença está distribuída em 22 unidades federadas, abrangendo as cinco regiões brasileiras e se encontra em expansão para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste.

Em 1990, 90% do total de casos se concentrava na região Nordeste e, em 2009, 47,5% foram atribuídos a essa região. No período de 1998 a 2009, em média, 3.349 casos foram registrados por ano, e tem se observado um aumento gradativo da letalidade, de 3,4% em 1999 para 5,7% em 2009, um incremento de 67,6%. Os indivíduos que mais evoluem para o óbito são os menores de 1 ano e os maiores de 50 anos (BRASIL, 2011a).

Essa endemia apresenta comportamento epidemiológico cíclico, com elevação de casos em período médios de cinco anos (BRASIL, 2011b). Até a década de 70, essa patologia estava associada às áreas rurais. Porém, nas últimas décadas, observou-se uma urbanização dessa doença em importantes cidades do nordeste e sudeste brasileiro, como Teresina (Piauí), São Luiz (Maranhão), Natal (Rio Grande do Norte), Campo Grande (Mato Grosso do Sul) e Belo Horizonte (Minas Gerais) (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). Acredita-se em que essa urbanização resultou das alterações ambientais provocadas pelo homem, associada com a rápida e intensa migração da população rural para as periferias urbanas, em condições precárias de saneamento, além da interação com hospedeiros silvestres e cães infectados em áreas onde não ocorria transmissão. A fácil adaptação do vetor ao peridomicílio também é um fator influente na urbanização da leishmaniose visceral (MAIA-ELKHOURY et al., 2008). As áreas de maiores concentrações de caso no Brasil estão representadas na Figura 2. Nas áreas atingidas, a infecção canina tem precedido a ocorrência de casos humanos, e apresentando uma maior prevalência (BRASIL, 2008).

Figura 2. Áreas de maior concentração de casos de leishmaniose visceral.



Fonte: Brasil (2008).

O grupo etário mais afetado pela doença são as crianças menores de 10 anos (58% dos casos), provavelmente pela imaturidade imunológica celular e maior exposição ao vetor no peridomicílio. O quadro clínico se agrava quando está associado à desnutrição. Em relação ao sexo, os homens são os mais atingidos, compreendendo cerca de 61% dos casos (BRASIL, 2008).

A doença tem sido considerada emergente em um grupo especial de indivíduos, os portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (BRASIL, 2006). Desde o início da década de 90, tem-se observado um aumento expressivo no número de casos da coinfeção HIV/*Leishmania*, principalmente no sudoeste europeu, no sul da Ásia, na África Subariana e na América do Sul, onde o Brasil é o país onde apresenta o maior número de casos das duas infecções. Em 2006, ao cruzar os bancos de dados de leishmaniose visceral e aids¹, identificou-se 176 casos de coinfeção, o que representou naquele ano, 1,1% dos casos de leishmaniose visceral (BRASIL, 2011b).

O movimento da leishmaniose visceral para os grandes centros urbanos, associado à interiorização da aids no Brasil, levou ao aumento de casos da coinfeção HIV/*Leishmania*. A coinfeção ocorre geralmente em adultos dos 31 aos 50 anos, ao contrário do que ocorre na população imunocompetente, onde a leishmaniose é mais frequente na infância, sendo em sua maioria do sexo masculino (CARRANZA-TAMAYO et al., 2009; NUNO MARQUES et al., 2007). Nessa associação de infecções não se tem definição de um perfil clínico. O que se observa é um aumento no envolvimento de órgãos não pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear e elevação de recidivas. Porém, a tríade clássica da leishmaniose visceral é também a mais comum na coinfeção: hepatoesplenomegalia, febre e pancitopenia (BRASIL, 2008). Estima-se que entre 10 – 30% de todos os pacientes portadores da coinfeção são diagnosticados após a identificação dos parasitos em localizações atípicas (CAVALCANTI et al., 2012; ROSENTHAL et al. 1995, 2000).

De acordo com os dados do Sistema de Informação de Agravos e Notificação (SINAN), o número de casos de coinfeção aumentou de 21 em 2001 para 86 em 2005 (MAIA-ELKHOURY et al., 2008). O verdadeiro impacto da realidade desta coinfeção está provavelmente subestimado, já que a mesma não é uma infecção oportunista de aids (NUNO MARQUES et al., 2007). Devido ao aumento de casos dessa coinfeção, enfoca-se a inclusão

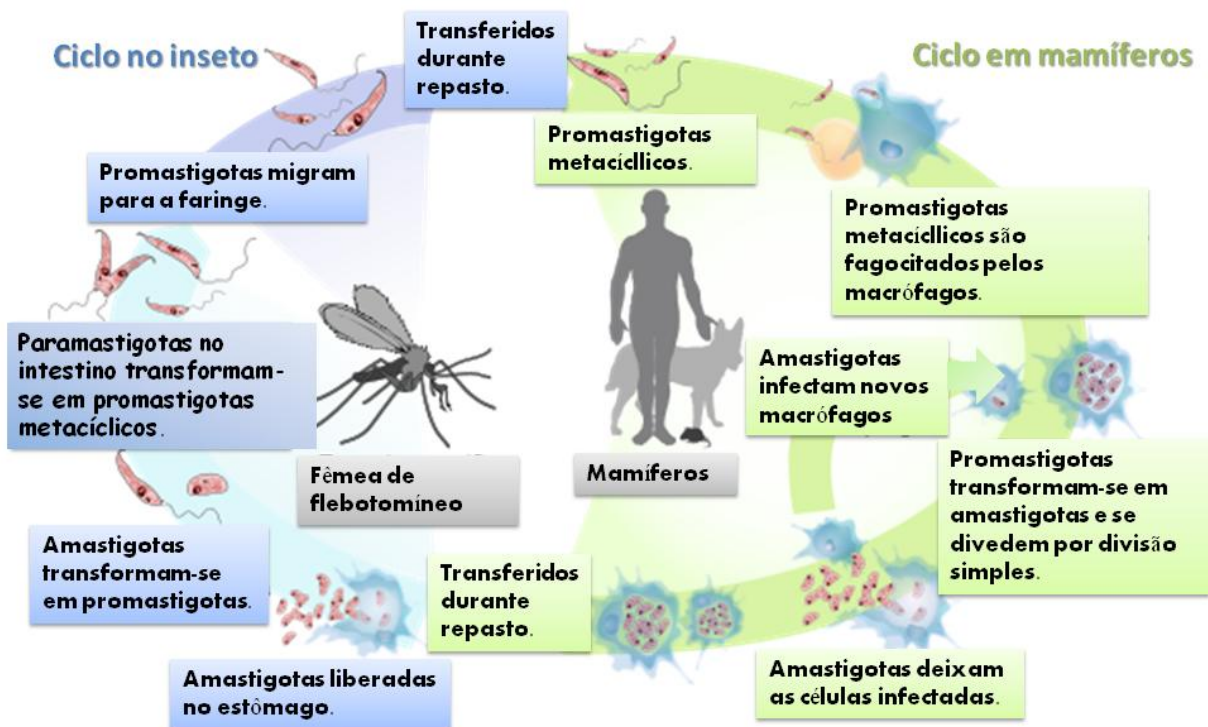
¹ Aids é a forma substantivada para a sigla inglesa AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) que denomina a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).

da leishmaniose visceral na lista de infecções oportunistas sugestivas do diagnóstico de aids (CATORZE, 2005). A associação dessas duas infecções parece exercer um efeito negativo em ambas as doenças, pois a leishmaniose visceral prejudica a resposta imune ao HIV, enquanto esta infecção viral afeta a apresentação clínica e o prognóstico da doença (PINTADO et al., 2001). Devido à diferença de abordagens na presença da coinfeção, é recomendado para todo paciente com leishmaniose visceral, independente da idade, a realização de sorologia para HIV (BRASIL, 2008).

2.2 Agente etiológico: ciclo biológico e transmissão

Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos ao homem e as demais espécies de hospedeiros vertebrados por insetos fêmeas do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. Nas Américas, o agente etiológico é *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). A transmissão acontece quando uma fêmea de flebotomíneo infectada realiza seu repasto sanguíneo e repassa o parasito ao indivíduo (REY, 2001) (Figura 3).

Figura 3. Ciclo biológico de *Leishmania* spp.



Fonte: adaptado do Wikipedia (LEISHMANIOSE, 2012).

No estômago do inseto, as formas amastigotas ingeridas durante o repasto sanguíneo transformam-se em promastigotas que sofrem um processo de divisão binária. Essas formas flageladas migram para a junção dos intestinos médio do inseto, onde se transformam em formas paramastigotas que se fixam na mucosa por meio de hemidesmossoma. Os paramastigotas se dividem e se transformam novamente em promastigotas, que migram para a faringe do inseto, onde se transformam em promastigotas metacíclicos, que são as formas infectantes. Durante um novo repasto, essas formas são inoculadas no mamífero e fagocitadas por macrófagos, células dendríticas e ou neutrófilos atraídos para o sítio de inoculação da pele. Uma vez dentro do fagossomo, os promastigotas diferenciam-se em amastigotas que se multiplicam por divisão simples até ruptura da célula hospedeira (BRASIL, 2008; FREITAS-JR, 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010a).

No Brasil, os vetores envolvidos no ciclo biológico são das espécies *Lutzomyia longipalpis*, sendo a principal e encontrada nas cinco regiões, e a *Lutzomyia cruzi*, encontrada no Mato Grosso do Sul. Esses insetos são conhecidos popularmente por mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros, e tem atividade crepuscular e noturna (BRASIL, 2008; MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

O vetor, que primariamente se encontrava em matas participando do ciclo primário de transmissão da doença, facilmente adaptou-se as áreas rurais e, recentemente, está adaptado aos ambientes urbanos e periurbanos, podendo ser encontrados no intra e peridomicílio (BRASIL, 2006). A densidade populacional desse inseto aumenta durante os períodos chuvosos, o que leva a um aumento na transmissão da doença durante e logo após as chuvas (BRASIL, 2008).

Os indivíduos infectados são chamados de hospedeiros e, dentre estes, aqueles que tem um papel na manutenção do parasito na natureza são chamados de reservatórios. Esses, no contexto epidemiológico, representam a principal fonte de infecção dos flebotomíneos. O cão doméstico é considerado o reservatório epidemiologicamente mais importante para a leishmaniose visceral americana. O ciclo se mantém em focos definidos por uma alta prevalência (acima de 25%) de leishmaniose visceral canina e flebotomíneo (MALTEZOU et al., 2000). O ciclo onde há um componente zoonótico, dificulta a eliminação da doença. A Organização Mundial de Saúde (OMS) não prevê eliminação global nem regional para a doença até 2015. Espera-se que em 2020 se atinja a eliminação (1 caso/10.000 habitantes) regional no subcontinente indiano, onde a transmissão ocorre homem – vetor – homem, sem implicação de reservatório animal no ciclo biológico (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

2.3 Diagnóstico da leishmaniose visceral

Programas de controle para leishmaniose visceral tem sido propostos visando a redução de casos dessa doença e, conseqüentemente, a letalidade. No entanto, para o sucesso desses programas, o diagnóstico precoce e tratamento imediato são essenciais. As formas de diagnóstico são geralmente classificadas em diagnósticos clínico-epidemiológico e laboratoriais. Dentro desse último estão as técnicas parasitológicas, imunológicas e moleculares.

2.3.1 Diagnóstico clínico-epidemiológico

Clinicamente, a doença é caracterizada por longos períodos de febre, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia, levando a óbito quando não tratada em 90% dos casos (MAIA-ELKHOURY et al., 2008; WERNECK et al., 2003). Assim, um indivíduo que mora em área endêmica e apresenta quadro febril por mais de duas semanas e esplenomegalia deve ser investigado por técnicas laboratoriais para leishmaniose visceral (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010b). O período de incubação, entre o momento da infecção e aparecimento dos sintomas varia de 10 dias a 24 meses, com média de tempo de 2 anos e 6 meses (BRASIL, 2008).

As manifestações clínicas refletem o desequilíbrio entre a multiplicação dos parasitos nas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), a resposta imunológica do indivíduo e o processo inflamatório subjacente (BRASIL, 2008). O diagnóstico clínico é de difícil conclusão, pois os sinais e sintomas da leishmaniose visceral se confundem com os de outras enfermidades, como esquistossomose, hepatite, malária, toxoplasmose aguda, doenças hematológicas e autoimunes, principalmente na fase inicial da leishmaniose visceral (BRASIL, 2006). Devido à superposição das áreas endêmicas, na maioria dos casos o diagnóstico diferencial só pode ser concluído por meio de provas laboratoriais.

O Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2008) define as seguintes formas da doença: inaparente ou assintomática, onde não há manifestações clínicas e o diagnóstico é realizado pela pesquisa de anticorpos; e os períodos da doença, que compreendem o período inicial ou fase aguda, período de estado e período final. Na fase aguda encontra-se a maioria dos casos com manifestações clínicas. O indivíduo apresenta febre com duração inferior a 4 semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia (Figura 4). Em área endêmica, geralmente o indivíduo apresenta quadro clínico discreto, de curta duração, principalmente crianças,

evoluindo para cura espontânea (fase oligossintomática). No período de estado, o indivíduo tem febre irregular, emagrecimento, palidez e aumento acentuado da hepatoesplenomegalia. Essa fase pode durar mais de dois meses e frequentemente há comprometimento geral do indivíduo. Quando o indivíduo atinge o período final da doença, na ausência do diagnóstico e do tratamento, há uma evolução do quadro, com febre contínua, desnutrição (cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca), edemas de membros inferiores, podendo evoluir para anasarca (edema generalizado). Podem surgir quadros de hemorragia, icterícia e ascite. O óbito acontece na maioria dos casos por infecções bacterianas e/ou sangramentos.

Figura 4. Criança com leishmaniose visceral na fase aguda, apresentando hepatoesplenomegalia.



Fonte: Brasil (2006).

Pequena parcela dos indivíduos infectados desenvolve sinais e sintomas. Estima-se que, em regiões endêmicas, 20% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma clássica da doença. A maioria apresenta a forma inaparente ou assintomática, o que dificulta o diagnóstico da doença, prejudicando uma intervenção terapêutica adequada (BRASIL, 2008; BRASIL, 2011b).

2.3.2 Diagnóstico parasitológico

O padrão ouro no diagnóstico laboratorial é a demonstração de formas amastigotas no aspirado de medula óssea, baço, linfonodos ou fígado. Na coleta do material é preferível a punção da medula óssea, por ser um procedimento mais seguro. No caso do baço, este deve ser realizado em condições cirúrgicas por oferecer um maior risco. Porém é o método que oferece maior sensibilidade (90%-95%) para demonstração do parasito, seguida pelo aspirado de medula óssea, biópsia hepática e aspiração de linfonodos (BOELAERT et al., 2007).

O material obtido é utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório (GONTIJO; MELO, 2004). O MS recomenda que no exame direto, após coloração do material em lâminas pelas colorações de Giemsa, Wright, Leishman ou Panóptico, deve ser examinados 200 campos antes de considerar uma lâmina negativa (BRASIL, 2006). A acurácia dessa técnica é influenciada pela habilidade do profissional que realiza a leitura e pela qualidade dos reagentes empregados (CHAPPUIS et al., 2007). Essas punções são consideradas procedimentos invasivos, podem causar complicações sérias em algumas ocasiões e exigem ambientes apropriados para a coleta, não sendo procedimentos adequados para estudos epidemiológicos em larga escala, e muitas vezes são também inadequados para diagnósticos individuais (HAILU et al., 2005; SILVA; STEWART; COSTA, 2005; SUNDAR; RAI, 2002).

Outra forma de diagnóstico parasitológico é a cultura do material aspirado ou do sangue. As formas amastigotas presentes nesse material biológico quando inoculadas em meios de cultura especiais contendo ágar e sangue de coelho, transformam-se em formas promastigotas que são visualizadas pela microscopia. O meio mais utilizado para o cultivo de *L. infantum* é o Neal, Novy, Nicole (NNN). Um aumento e aceleração da positividade da cultura podem ser alcançados com a associação de meio líquido como o Liver infusion *triptose* (LIT) ou o Schneider. As culturas são mantidas entre 24 – 26° C e são observadas por até quatro semanas. As culturas positivas devem ser encaminhadas para a identificação da espécie em laboratórios de referência (BRASIL, 2008).

Na coinfeção HIV/*Leishmania*, é possível obter cultura positiva de sangue, o que é muito raro em indivíduos imunocompetentes, devido ao maior número de parasitos circulantes (ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA et al., 2010; PINTADO et al., 2001). A partir da cultura podem-se isolar os parasitos para identificação da espécie através do padrão de isoenzimas ou anticorpos monoclonais (ABDA et al., 2011). No caso da coinfeção, essa identificação é recomendada pois espécies dermatólicas podem visceralizar ou na leishmaniose visceral, úlceras podem surgir na pele (BRASIL, 2011b).

2.3.3 Diagnóstico Imunológico

A leishmaniose visceral induz no indivíduo uma forte resposta imunológica através da estimulação de linfócitos B, produzindo anticorpos específicos e inespecíficos em elevados níveis que são detectáveis por técnicas convencionais de sorologia. Pela coleta sanguínea ser

menos invasiva, em comparação as punções dos métodos parasitológicos, os ensaios imunológicos são os mais aplicados na rotina para o diagnóstico dessa patologia. Dentre os métodos aplicados, destacam-se a imunofluorescência indireta (IFI), o teste de aglutinação direta (DAT), os imunoenaios enzimáticos (ELISA) e os testes imunocromatográficos (rK39 – ICT). Porém, apesar da maior facilidade para obtenção das amostras, os testes sorológicos divergem em sensibilidade e especificidade e podem continuar a apresentar reações cruzadas (GONTIJO; MELO, 2004). Os anticorpos continuam detectáveis após anos da cura, o que prejudica o diagnóstico de recidivas com segurança pela sorologia. Além desses problemas, indivíduos saudáveis, que moram em áreas endêmicas, com nenhuma história de leishmaniose visceral apresentam anticorpos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010a).

Para o diagnóstico em humanos, o MS do Brasil preconiza a IFI, nos quais são considerados positivos os títulos a partir da diluição 1:80 (BRASIL, 2008). Estudos descrevem sensibilidade de 82 a 100% e especificidade de 78 a 92%, dependendo da preparação antigênica e da espécie de *Leishmania* utilizada (ALAM et al., 1996; KAR, 1995; MITTAL; BATHIA; SEHGAL, 1991). Atualmente, o *kit* de IFI é produzido por Biomanguinhos, unidade da Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro-RJ, e distribuído pelo MS para laboratórios públicos brasileiros. Contudo a IFI apresenta baixa especificidade, exige na sua execução pessoal treinado e é uma reação dispendiosa. Além do mais, esse ensaio apresenta reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (BRASIL, 2006; SUNDAR, RAI, 2002).

A OMS preconizou para o programa de controle da leishmaniose visceral dois testes rápidos, o Teste de Aglutinação Direta (DAT, do inglês Direct Agglutination Test) e o rK39 – ICT (Imuno Chromatography Test) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010b). O DAT tem alta sensibilidade e especificidade, maior do que a IFI, além de ser mais barato e de fácil execução. Esta técnica é muito utilizada nos países da África Subsariana, Índia e Nepal, com sensibilidade de 91 a 100% e especificidade de 72 a 100% (ABDALLAH et al., 2004; EL HARITH et al., 1988; ZIJLSTRA et al. 1991). Porém, o DAT apresenta problemas na padronização e controle de qualidade do antígeno, longo período de incubação e o alto custo do antígeno (GONTIJO; MELO, 2004; SRIVASTAVA et al., 2011). Andrade et al. (1989) foram os primeiros a realizar um estudo do uso do DAT no Brasil, e verificou reações cruzadas com doenças de chagas, filariose, esquistossomose, malária e leishmaniose mucocutânea.

No caso do rK39 – ICT, baseado na reação com o antígeno rK39, é um excelente método para trabalhos de campo (DOURADO et al., 2007; SRIVASTAVA et al., 2011). Em

uma meta-análise, Boelaert et al. (2008) encontraram valores de 98,4 – 100% de sensibilidade e de 81,2 – 96,4% de especificidade. Porém, a desvantagem de apresentar reação cruzada com malária, febre tifoide e tuberculose, não faz do teste rápido uma ferramenta de diagnóstico segura (CHAPPIUS et al., 2006)

Em um estudo feito por Dourado (2006), concluiu-se que o gasto com a imunocromatografia é US\$ 2,71, enquanto que o custo com o diagnóstico parasitológico é superior US\$ 72,1, pois requer profissional médico qualificado, anestesia e materiais específicos para realização do aspirado de medula óssea ou vísceras. A sorologia por IFI teria um custo de US\$ 8,56.

Os ensaios sorológicos, na coinfeção HIV/*Leishmania* apresentam sensibilidade de 30% a 60%, onde cerca de 20% dos pacientes coinfectados apresentam resultados negativos devido à baixa produção de anticorpos (BRASIL, 2006). Nesses pacientes, a pesquisa de antígenos é a melhor escolha para um diagnóstico mais seguro e menos invasivo. Em pacientes imunocompetentes, a pesquisa antigênica utilizando soro não é adequada devido aos altos níveis de anticorpos, formando imunocomplexos, o que dificulta a reação (ATTAR et al., 2001).

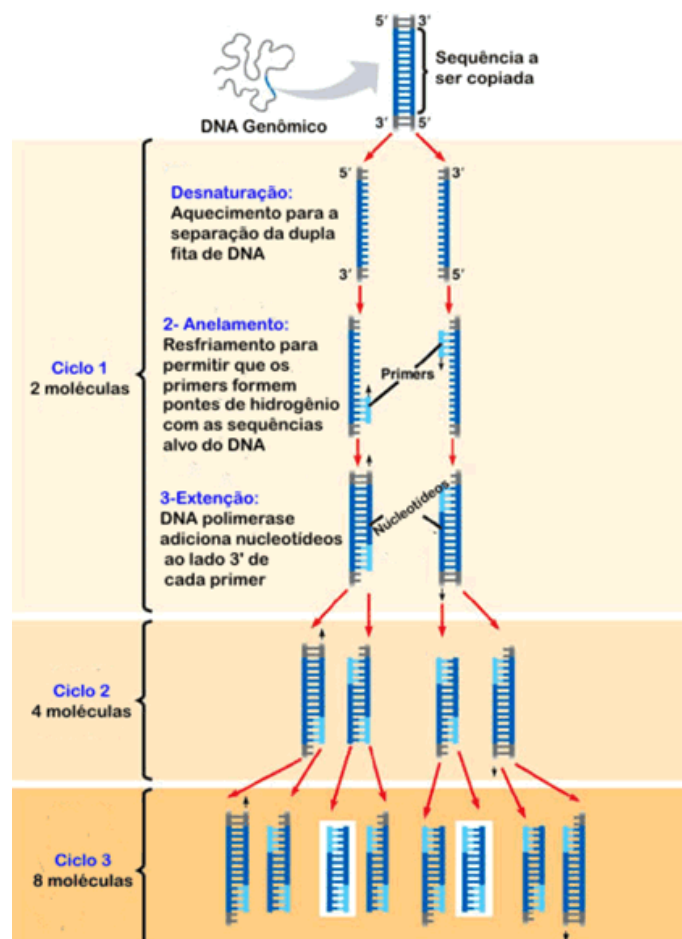
A alternativa de utilizar urina como matriz biológica para pesquisa de antígenos pela aglutinação em látex (KAtex) tem sido apontada como uma ferramenta promissora (ATTAR et al., 2001; COLOMBA et al., 2009; GARCÍA-GARCÍA et al., 2006; GAUGANI et al., 2008; KALLEL et al., 2007). Um teste baseado na aglutinação de um carboidrato de baixo peso molecular, termoestável presente na urina de portadores de *L. infantum* foi desenvolvido. Essa ferramenta de diagnóstico mostrou-se 79,1 – 94,1% específico e 60,4 – 71,6% sensível quando avaliado com casos bem definidos e controles negativos de áreas endêmicas e não endêmicas na Índia (BOELAERT et al., 2008). Parece ser um teste promissor para a avaliação de cura (SRIVASTAVA et al., 2011).

2.3.4 Diagnóstico Molecular – Polymerase Chain Reaction (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação extremamente sensível, podendo detectar uma única molécula de DNA numa amostra ou um fragmento contendo o alvo desejado. Na reação, regiões específicas do DNA, são amplificadas enzimaticamente. Durante a PCR, um segmento específico de ácido desoxirribonucleico (DNA) de fita dupla ou de fita simples pode ser amplificado através de sucessivos ciclos (MELO, 2006).

Essa técnica molecular baseia-se em ciclos que se repetem na forma de três etapas que ocorrem em diferentes temperaturas de incubação: desnaturação, anelamento e extensão. Na primeira etapa, a desnaturação, a fita dupla do DNA alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 90/95°C, para quebrar as ligações tipo ponte de hidrogênio que mantêm as fitas unidas. Esta etapa expõe as fitas simples de DNA, denominada “template” ou molde, e o iniciador vai se anelar a outra fita de DNA que contenha sequência complementar a ele. Na etapa mais crítica da PCR, a de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 50/60°C, dependendo essencialmente do tamanho e sequência dos iniciadores utilizados. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão no sentido 5'- 3' (TAYLOR, 1993) a uma velocidade de cerca de 24 nucleotídeos por segundo (SCHEINERT; BEHRENS; KAHLE, 1995). Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. À medida que os ciclos vão se repetindo, os iniciadores são consumidos e o número de novas fitas de DNA aumenta (EISENSTEIN, 1990). Na figura 5 tem-se um esquema das etapas da PCR.

Figura 5. Etapas que compõem a amplificação de alvos na cadeia de DNA pela PCR.



Os produtos de cada ciclo, denominados amplicons, servem de molde para os ciclos subsequentes. Esses são produzidos de forma exponencial e não linear a cada ciclo, de acordo com a seguinte equação:

$$N = N_0 \times 2^n,$$

Onde N = número final de cadeias de DNA, N_0 = número inicial de molde e n = número de ciclos (MELO, 2006). Uma vez que a quantidade de DNA da sequência alvo aumenta exponencialmente a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de sequência alvo (TAYLOR, 1993).

Vários sistemas baseados em PCR têm sido desenvolvidos para *Leishmania* spp, e muitas sequências alvo já foram identificadas, como também um grande número de “primers”, ou iniciadores, desenhados (SCHALLING; OSKAN; DUBESSAY, 2002). A escolha do alvo depende de alguns parâmetros, tanto biológicos como físico-químicos. Para que uma sequência de DNA possa ser considerada um marcador molecular, ela deve apresentar diferenças entre famílias, gêneros, espécies ou indivíduos (FLOETER-WINTER, 2010).

As abordagens de PCR têm encontrado excelente correlação com os resultados obtidos pelas técnicas convencionais de visualização do parasito, independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente (WEISS, 1995). A PCR tem sido vista como um diagnóstico alternativo quando o paciente apresenta como hipótese diagnosticada leishmaniose visceral ou coinfeção, mas a microscopia e sorologia são negativas ou indeterminadas (ALAM et al., 2009). Os ensaios já foram padronizados com diversos fluidos corporais, como sangue, aspirado de medula óssea, soro e urina (ANDRESSEN et al., 1997; FISA et al., 2008). Recentemente, a utilização de urina como amostra para PCR na pesquisa de DNA de *Leishmania* sp tem se mostrado promissora, pois além da coleta não invasiva, podendo ser realizada em qualquer momento do dia, as técnicas têm mostrado sensibilidade em torno de 88 – 97%, e uma especificidade de 100% (FISA et al., 2008; MOTAZEDIAN et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2007).

A PCR tem apresentado uma ótima sensibilidade quando o alvo a ser amplificado apresenta múltiplas cópias, como o rRNA e o DNA do cinetoplasto (kDNA) (LACHAUD et al., 2002). No kDNA, são cerca de 50 maxicírculos com 20000 a 35000 pb, que contem genes que codificam proteínas mitocondriais e o RNA ribossomal (rRNA), enquanto os minicírculos são no número de 10000 a 20000, com sequências de 500 a 2500 pb (CORTES, 2008).

Em eucariotos, o rRNA é uma família multigênica organizada em unidades repetidas ou em *tandem* dentro da região organizadora nucleolar. Cada unidade repetida consiste de regiões altamente conservadas que codificam os genes para os RNAs 18S, 5,8S e 28S, intercaladas por regiões mais variáveis de espaçadores não-codificantes (ITS). Na maioria dos animais, existem de 100 a 500 cópias do gene rRNA no genoma nuclear (POLANCO et al., 1998). Apesar do baixo número de cópias do rDNA em comparação ao kDNA, suas subunidades são bem exploradas no desenvolvimento de ferramentas moleculares para diagnóstico da infecção por *Leishmania*. O ITS-1 é um dos alvos mais explorados na identificação de *Leishmania* spp na aplicação de enzimas de restrição, pois apresenta padrões de bandas que se distinguem entre as espécies (SCHÖNIAN; KUHLS; MAURICIO, 2011).

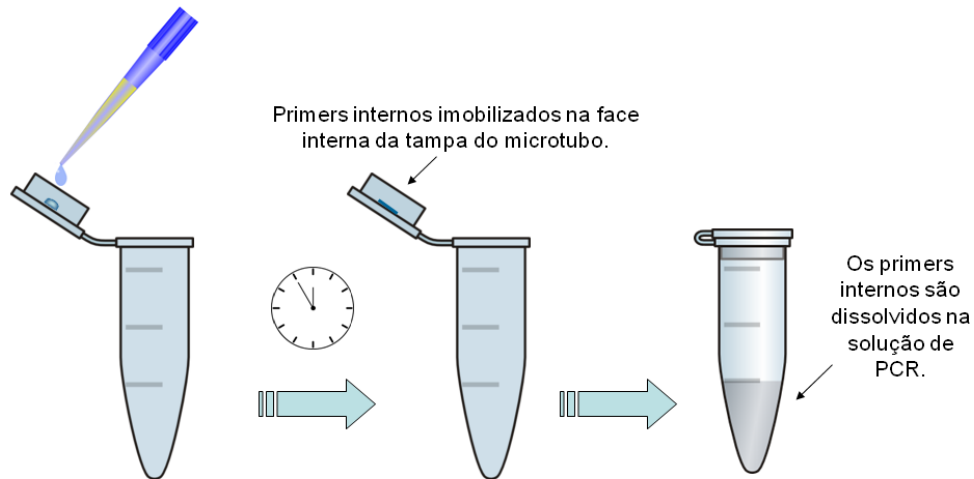
Uma abordagem molecular baseada em PCR é a nested-PCR, que se realiza em duas etapas consecutivas (duas PCR simples), o que aumenta sua sensibilidade e especificidade. Essa variante, devido a sua alta sensibilidade tem sido recomendada para a detecção de alvos em amostras biológicas que apresente escassez de DNA (DUPIN et al., 2002). Schönian et al. (2003) desenvolveram uma nested-PCR para não apenas realizar o diagnóstico da leishmaniose visceral, como também para a identificação do parasito. Esses autores utilizaram dois diferentes pares de primers que amplificam a ssu rRNA e o ITS-1, obtendo bons resultados de sensibilidade em diferentes amostras biológicas. A identificação das espécies de relevância médica foi realizada pela aplicação de enzima de restrição sobre os produtos oriundos da amplificação do alvo ITS-1.

Porém, a necessidade de abertura do tubo de reação para a transferência dos amplicons, que serve de molde para a segunda etapa de amplificação, aumenta o risco de contaminação e o aparecimento de resultados falso-positivos (MELO, 2006). A junção de duas reações de amplificação em um único tubo (Single Tube Nested PCR - STNPCR) reduz consideravelmente o risco de contaminação, além de oferecer uma redução nos gastos com reagentes, favorecendo a implementação do uso da PCR na rotina do diagnóstico da leishmaniose visceral (LLOP et al., 2000; ABATH; MELO; WHERKHAUSER, 2002).

Há basicamente duas abordagens básicas utilizadas no desenvolvimento da nested-PCR em único tubo. Elas envolvem uso de iniciadores internos e externos com distintas temperaturas de anelamento (esta abordagem limita bastante as sequências que poderiam vir a servir de alvo para amplificação, como também possibilita o aumento do aparecimento de bandas inespecíficas), e a separação física dos reagentes necessários à segunda etapa de amplificação (TAO et al., 2004). Abath, Melo e Wherkhauser (2002) desenvolveram uma nova variante da STNPCR, onde o sequestro dos primers internos consistia na imobilização

dos mesmos na interface interna da tampa do tubo de reação (Figura 6). Essa nova modalidade de PCR é simples de ser realizada, reprodutível e robusta.

Figura 6. Esquema da STNPCR.



Fonte: a autora.

A STNPCR já foi desenvolvida e padronizada para o diagnóstico detecção de DNA de *Schistosoma mansoni* (ABATH; MELO; WHERKHAUSER, 2002) *Plasmodium falciparum* (MONTENEGRO et al., 2004) *Yersinia pestis* (SOUZA et al., 2007) e para identificação de sorotipos do vírus dengue (GOMES et al., 2007).

3 JUSTIFICATIVA

O diagnóstico precoce da leishmaniose visceral permite um melhor prognóstico ao paciente, pois quando não tratados os casos tem maior letalidade. As metodologias usualmente utilizadas para o diagnóstico ainda apresentam deficiências, de forma que ainda hoje permanece o desafio para obtenção de um método sensível, específico, simples, rápido e de baixo custo.

No diagnóstico laboratorial, os exames parasitológicos baseados em microscopia e cultura de parasitos são laboriosos, demorados, requerem formas invasivas de coleta e apresentam sensibilidade baixa ou muito variável. Em relação aos testes sorológicos, estes estão bem estabelecidos e são de uso mais frequente, porém tais técnicas têm apresentado problemas quanto à especificidade e reprodutibilidade.

A técnica de PCR é uma ferramenta útil, pois é suficientemente sensível, específica e rápida para atender as necessidades dos programas de controle. Esse diagnóstico vem a suprir algumas lacunas importantes presentes nos métodos tradicionais de diagnóstico. Por exemplo, permite detectar, de maneira específica, sequências exclusivas do genoma do parasito sem necessidade de seu isolamento em cultura, utilizando amostra biológica, como urina, obtida por métodos não invasivos. Isso representa mais rapidez para geração de resultados, menor gasto com mão-obra técnica e maior aceitação pelo paciente.

Vale ressaltar que a pesquisa de alternativas diagnósticas mais sensíveis e específicas é prioritária para auxiliar a prevenção, vigilância e controle das leishmanioses. Assim, avaliação de PCR sensíveis e específicas como a nested-PCR, composta de duas PCR simples, no diagnóstico da leishmaniose visceral está inserida nesse contexto. Como essa variante da PCR possui o inconveniente de resultados falsos positivos pelo risco de contaminação na abertura do tubo para passagem dos produtos da primeira reação para a segunda reação, sugere-se então o desenvolvimento de uma nested-PCR que eliminasse essa etapa de risco, como a nested-PCR em único tubo (STNPCR). Portanto, esse trabalho está inserido nesse contexto, pois teve como objetivo desenvolver sistemas baseados em nested-PCR convencional e em único tubo para o diagnóstico da leishmaniose visceral, utilizando como fonte de DNA sangue, soro e urina. Essa última de coleta não invasiva, proporcionando melhor conforto para o paciente e flexibilidade no horário de coleta, pois pode ser realizada a qualquer momento do dia.

4 HIPÓTESE

Sistemas de PCR para a detecção da infecção de leishmaniose visceral através do sangue, soro ou urina, baseados em nested-PCR convencional e em único tubo promovem um diagnóstico seguro.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Desenvolver sistemas baseados em nested-PCR convencional e em único tubo para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana.

5.2 Objetivos específicos

- a) Fazer levantamento bibliográfico para escolha dos alvos moleculares.
- b) Desenvolver sistemas de PCR simples para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana em sangue, soro e urina.
- c) Desenvolver sistemas de nested-PCR convencional e em único tubo para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana em sangue, soro e urina.
- d) Avaliar a especificidade dos sistemas baseados em PCR, utilizando DNA purificado de *Wuchereria bancrofti*, *Trypanossoma cruzi*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Schistosoma mansoni*.

6 ARTIGOS

Esse capítulo apresenta os quatro artigos que fizeram parte dessa tese. No primeiro artigo foi realizada uma revisão com as publicações sobre PCR aplicada ao diagnóstico da leishmaniose visceral. O segundo artigo traz os resultados dos ensaios de otimização das PCR simples, para então padronizar a nested-PCR convencional e, a seguir, a nested-PCR em único tubo. No terceiro artigo está descrita a avaliação de quatro protocolos para a extração de DNA em urina. O último artigo, o artigo quarto, traz os dados dos sistemas desenvolvidos nesse trabalho quando aplicados às amostras biológicas descritas acima.

6.1 Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana.

Molecular targets used in PCR for the diagnosis of human visceral leishmaniasis.

Autores:

Maria Almerice Lopes da Silva¹

Rafael Acioli de Medeiros¹

Sinval Brandão-Filho¹

Fábio Lopes de Melo¹

Zulma Medeiros¹

Instituição que pertencem:

¹Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Endereço de correspondência do autor responsável:

Maria Almerice Lopes da Silva, Laboratório de Doenças Transmissíveis, Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Recife – PE – Brasil, 50670-420.

Telefone: (81)21012695

O artigo foi publicado na Revista Eletrônica de Farmácia, v.7, n.3, p. 1 – 15, 2010.

ALVOS MOLECULARES UTILIZADOS EM PCR PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA.

MOLECULAR TARGETS USED IN PCR FOR THE DIAGNOSIS OF HUMAN VISCERAL LEISHMANIASIS.

Resumo

A dificuldade do diagnóstico do calazar humano traz a necessidade do emprego de ferramentas sensíveis e específicas. Nesse contexto, as abordagens em PCR vem se destacando, com uma ampla gama de alvos e iniciadores já padronizados. Porém, há uma carência de dados sistematizados que apontem qual o melhor alvo e iniciadores a serem utilizados em determinadas regiões e em situações específicas. Assim o presente trabalho visou descrever as informações disponíveis na literatura para auxiliar na escolha dos sistemas de PCR pelos profissionais de saúde na rotina dos laboratórios dos serviços. A identificação dos trabalhos foi feita por busca em bases de dados, que após leitura dos resumos/abstracts foram inclusos nessa revisão. O artigo aponta quais as vantagens e desvantagens dos alvos moleculares e iniciadores, oferecendo informações para a escolha dos alvos e iniciadores adequados segundo a necessidade do serviço pelos profissionais.

Descritores: diagnóstico; leishmaniose visceral; Reação em Cadeia da Polimerase; saúde pública

Abstract

The difficulty of diagnosing human leishmaniasis brings the necessity of using sensitive and specific tools. In this context, PCR approaches have been increasing, with a wide range of targets and primers already standardized. However, there is a lack of standardized data that suggest what is the best target and primers to use in certain regions and in specific situations. Thus, this work aims to describe the information available in the literature to assist in the selection of PCR systems for health professionals in routine laboratory services. The identification of the papers was done by searching in databases, which after reading the summaries were included in this review. The article points out the advantages and disadvantages of targets and primers, providing information for the choice of targets and appropriate primers according to the needs of the service for the professionals.

Key-words: diagnosis, leishmaniasis visceral, Polymerase Chain Reaction, public health.

1. Introdução

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma doença sistêmica que pode ser fatal se não tratada. No continente americano, o Brasil apresenta a maior endemicidade, possuindo cerca de 97% de todos os casos americanos. A Região Nordeste brasileira possui 82,5% das notificações brasileiras (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

No diagnóstico laboratorial, a demonstração de formas amastigotas no aspirado de medula óssea, baço, linfonodos ou fígado é considerado o padrão ouro. Porém, são procedimentos invasivos, possuem sensibilidade variável e contra-indicações. Em relação aos testes sorológicos disponíveis a (Imunofluorescência Indireta (IFI), o teste de aglutinação direta (DAT) e a imunocromatografia

utilizando o antígeno rK39) possuem limitações, tanto na sensibilidade quanto na especificidade (SANDAR & RAIA, 2002; GONTIJO & MELO, 2004; DOURADO et al., 2007). A pesquisa de antígenos em urina pela aglutinação em látex (KAtex) tem sido apontada como uma ferramenta promissora, mesmo nas difíceis condições de campo (ATTAR et al., 2001; GARCÍA-GARCÍA et al., 2006; KALLEL et al., 2007; GAVGANI et al., 2008).

A PCR tem sido vista como um diagnóstico alternativo quando o paciente apresenta como hipótese diagnóstica calazar ou co-infecção e microscopia e sorologia são negativas ou indeterminadas (ALAM et al., 2009). Os ensaios já foram padronizadas com diversos fluidos corporais, como sangue, aspirado de medula óssea, soro e urina (ANDRESEN et al., 1997; FISA et al., 2008). Vários sistemas baseados em PCR têm sido desenvolvidos para *Leishmania*, e muitas seqüências alvo já foram identificadas, como também um grande número de oligonucleotídeos iniciadores específicos (primers) desenhados.

Assim, o objetivo dessa revisão é sistematizar as informações, auxiliando profissionais e serviços de saúde na implantação dessa ferramenta na rotina de diagnóstico. A identificação dos artigos foi feita por busca nas bases de dados LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), MEDLINE (National Library of Medicine, Estados Unidos), PUBMED (National Institutes of Health) e SCOPUS, reunindo publicações em inglês, espanhol e português no período de 1999 a 2009. Os descritores utilizados foram: leishmaniose visceral ou visceral leishmaniasis e PCR. Foram excluídos os trabalhos que não objetivassem o diagnóstico por PCR para LV humana. Assim, a pesquisa resultou em 269 artigos. Após leitura de seus abstracts/resumos, 84 artigos foram selecionados para confecção desse manuscrito.

Os iniciadores citados foram submetidos à análise de homologia utilizando-se o servidor primer BLAST 2.0 (“Basic Local Alignment Search Tool”) do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) da biblioteca Nacional de Medicina do NIH (“National Institute of Health”), Maryland, EUA. No quadro 1 estão apresentados os iniciadores, com seus respectivas citações bibliográficas, alvos moleculares e primer-BLAST, que estão citados nesse trabalho.

Quadro 1. Alvos moleculares e iniciadores estudados para o diagnóstico da LV humana.

| Iniciadores | Autores | Alvo molecular | Análise pela ferramenta primer-BLAST |
|---|---------------------------|---|---|
| RV1: 5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3' RV2: 5'-CACCTGGCCTATTTTACACCA-3' | LE FICHOUX et al., 1999 | Minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) | <i>L. infantum</i> , <i>L. donovani</i> e <i>L. major</i> . |
| AJS31: 5'-GGGGTTGGTGTAATAAGGGCCGG-3' DeBY: 5'-CCAGGTTCCCGCCCCGGAG-3' | SMYTH et al., 1992 | | <i>Leishmania SP</i> |
| Ldl: 5'-AAATCGGCTCCGAGGCGGAAAC-3' 5'-GGTACACTCTATCAGTAGCAC-3' | SALOTRA et al., 2001 | e | <i>L. donovani</i> |
| MC1: 5'-GTTAGCCGATGGTGGTCTTG-3' MC2: 5'-CACCCATTTTCCGATTTTG-3' | CORTES et al., 2004 | | <i>L. infantum</i> , <i>L. chagasi</i> , <i>L. donovani</i> e <i>Caenorhabditis elegans</i> |
| R221: 5'-GGTTCCTTTCCTGATTTACG-3' R332: 5'-GGCCGGTAAAGGCCGAATAG-3' R223: 5'-TCCCATCGCAACCTCGGTT-3' R333: 5'-AAAGCGGGCGCGGTGCTG-3' | VAN EYS et al., 1992 | Subunidade menor do ribossomo (SSUrRNA) | <i>Trypanosomatidae</i> sp |
| 18S-L-F: 5'-CGTAGTTGAAGTGTGGCTGTGC-3' 18S-L-R: 5'-ACTCCCGTGTTTCTTGTTTCTTTGAA-3' | DEBORGGRAEVE et al., 2008 | | <i>Trypanosomatidae</i> sp |
| LITSR: 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3' L5.8S: 5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3' | EI TAI et al., 2000 | Espaçador Transcrito Interno (ITS) | <i>Trypanosomatidae</i> sp |

| | | | |
|--|-------------------------------|-----------------------|--|
| LITSV: 5'-ACACTCAGGTCTGTAAAC-3' L5.8SR: 5'-AAGTGCATAAGTGGTA-3' | | | |
| Hsp70sen: 5'-GACGGTGCCTGCCTACTTCAA-3' Hsp70ant: 5'-CCGCCCATGCTCTGGTACATC-3' | GARCIA et al., 1992 | Gene HSP70 | <i>Leishmania sp</i> , <i>Trypanosoma sp.</i> |
| LDS: 5'-GCGACGACAAGCCCATGATT-3' LDK: 5'- GCGTCGGCTCGTTGATGATG-3' | ARORA et al., 2008 | | <i>Trypanosomatidae</i> sp. |
| SG1: 5'-GTCTCCACCGAGGACCTCACCGA-3' SG2: 5'-TGATGTAGCCGCCCTCCTCGAAG-3' | GUERBOUJ et al., 2005 | Gene gp63 | <i>Leishmania SP</i> , <i>Crithidia fasciculata</i> , <i>Azotobacter</i> <i>vinelandii</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>stutzeri</i> , <i>Micromonas sp.</i> , <i>Streptomyces sp.</i> |
| PDD1: 5'-TCGGTGAGGTCCTCGGTGGAGAC-3' PDD2: 5'-CTTCGAGGAGGGCGGCTACATCA-3' | | | <i>L. infantum</i> , <i>L.</i> <i>braziliense</i> , <i>Burkholderia gluma</i> |
| TV255: 5'-AGTACGGCTGCGACACCTTGGAG-3' TV256: 5'-GTTCCGGCCCCACGGCATCACC-3' | TUPPERWAR et al., 2008 | | <i>Leishmania sp</i> , <i>Xylanimonas</i> <i>cellulosilytica</i> , <i>Corynebacterium</i> <i>efficiens</i> |
| K26f: 5'-ACGAAGGACTCCGCAAAG-3' K26r: 5'-TTCCCATCGTTTTGCTG-3' | HARALAMBOUS et al., 2008 | Gene K26 | Complexo <i>L.</i> <i>donovani</i> |
| Ext: 5'-AATTCGACGATCACGAGGTC-3' E2b: 5'-CGACTCGGTTGGCACACTG-3' | FISA et al., 2002 | Fragmentos gênicos | <i>L. infantum</i> |
| P-1: 5'-ACGAGGTCAGCTCCACTCC-3' P-2: 5'- CTGCAACGCCTGTGTCTA CG-3' | PIARROUX et al., 1993 | | <i>L. infantum</i> |
| Fme:5'-TATTGGTATGCGAACTTCCG-3' Rme:5'-CAGAACTGATACTTATATAGCG-3' | MARFURT et al., 2003a (94) | Gene do mini- exon | <i>Trypanosomatidae</i> sp. |
| S-1629: 5'-gggaattCAATAT/AAGTACAGAACTG S-1630: 5'- ggggaagcTTCTGTACTT/ATATTGGTA | KATAKURA et al., 1999 | | Múltiplos alvos |

2. Alvos moleculares e iniciadores

Os ensaios baseados em PCR constituem atualmente a principal abordagem no diagnóstico molecular. Além da pequena quantidade necessária de material biológico, outro ponto importante da PCR é a diferenciação dos agentes infecciosos, que pode ser feita pela análise de polimorfismo dos alvos (BHATTARAI et al., 2009). Os alvos são importantes pelas suas sensibilidade e especificidade, características do ensaio que são intrínsecas a escolha dos iniciadores, que podem resultar falso-positivos ou falso-negativos (DENIAU et al., 2003).

a. Minicírculo do cinetoplasto

O DNA do cinetoplasto (kDNA, do inglês kinetoplast) representa 20-25% do DNA do parasito e consiste em uma rede de moléculas circulares, concatenadas, divididas em maxicírculos e

minicírculos (TELLERIA et al., 2006). São cerca de 50 maxicírculos (com 20000 a 35000 pb (pares de base)), que contem genes que codificam proteínas mitocondriais e o RNA ribossomal (rRNA), enquanto os minicírculos são no número de 10000 a 20000, com sequências de 500 a 2500 pb (CORTES, 2008). Diante dos alvos que serão descritos nesta revisão, pode-se dizer que o minicírculo kDNA é o alvo mais estudado e aplicado nas pesquisas moleculares para o diagnóstico de calazar humano. Sua vantagem está no fato do grande número de cópias por célula.

Os iniciadores desenhados por Le Fichoux et al., 1999, foram os mais aplicados na amplificação do minicírculo do kDNA (quadro 1). A região amplificada é a LT1, que apresenta uma sequência de 145 pb, e os sistemas desenvolvidos já foram aplicados com sucesso na identificação de *Leishmania* em amostras de medula, sangue, soro e urina, de pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos (ATTAR et al., 2001; FISSORE et al., 2004; MARY et al., 2004, 2006; KONGKAEW et al., 2007; FAKHAR et al., 2008; MOTAZEDIAN et al., 2008; JUNIOR et al., 2009). Os bons resultados para esses iniciadores foram obtidos tanto utilizando técnicas convencionais de PCR como a PCR em Tempo Real (MARY et al., 2004; GERAMIZADEH et al., 2006; KONGKAEW et al., 2007; SUKMEE et al., 2008; VILLINSKIA et al., 2008). Os sistemas apresentaram valores de detecção de 0,001 parasito/mL, identificando DNA de *Leishmania* em portadores assintomáticos, quando as técnicas convencionais de diagnóstico falharam, indicando uma boa correlação entre os níveis de parasitemia e o estado clínico dos pacientes (MARY et al., 2004; FAKHAR et al., 2008). Porém, sistemas que produzem amplicons com baixo número de pb podem apresentar erros na interpretação dos resultados, devido ao tamanho próximo ao dos dímeros de iniciadores.

O par de primer, AJS31/DeBY (SMYTH et al., 1992) produz um fragmento de 805 pb do kDNA para *L. infantum* e *L. donovani*, e 780 pb para *L. chagasi* (LAMBSON et al., 1999, 2000; MONROY-OSTRIA et al., 2000; MORALES et al., 2001; RODRIGUES et al., 2005; BOTILDE et al., 2006). Ao se aplicar enzimas de restrições, Morales et al., 2002, distinguiram entre recidivas e reinfecções pós-tratamento na co-infecção por HIV/*Leishmania*. Resultados significantes também foram obtidos com o uso dos iniciadores Ld I (SELOTRA et al., 2001), que amplificam um fragmento de aproximadamente 600 pb, com uma detecção de até 1 fg de DNA de *L. donovani* (SREENIVAS et al., 2004; MAURYA et al., 2005; SHARMA et al., 2010). A especificidade dos iniciadores foi avaliada com DNA de *L. major*, *L. tropica*, *Plasmodium* spp., *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, onde não se observou amplificação (SELOTRA et al., 2001). Em relação aos iniciadores MC1/MC2, o produto da amplificação é uma banda de 447 pb (CORTES et al., 2004). Diante dos ensaios com amostras biológicas, esses iniciadores mostraram-se específicos para as espécies *L. donovani* e *L. infantum* (CORTES et al., 2004, 2006; ROLÃO et al., 2004).

Muitos outros iniciadores foram desenvolvidos nessa última década para pesquisa de DNA de *Leishmania* utilizando como alvo o Kdna (BRENIÈRE et al., 1999; MARTIN-SANCHEZ et al., 2001; ANDERS et al., 2002; KYRIAKOU et al., 2003; MARFURT et al., 2003a; DISCH et al., 2006; BRUSTOLONI et al., 2007; ASSIS et al., 2009). Esse alvo possui uma considerável heterogeneidade o que pode acarretar em perda da acurácia do ensaio, o que não é observado em outros alvos moleculares (MARY et al., 2004). Na aplicação de enzimas de restrição ao kDNA (PCR-RFLP), essa heterogeneidade dificulta a construção de padrões por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) devido ao grande número de fragmentos restritos, restringindo a utilização dos iniciadores entre isolados próximos ou apenas permite a identificação de grupos ou isolados de mesma área.

2.2. DNA ribossômico

O DNA ribossômico (rDNA) possui unidades repetidas ou em *tandem* dentro da região nucleolar. Nas células eucarióticas, há cerca de 100 a 500 cópias do gene rDNA no genoma nuclear, onde cada unidade de transcrição, é composta de uma região promotora líder, o espaçador transcrito externo (ETS – *External Transcribed Spacer*), uma região codificadora do rRNA 18S, um espaçador não-codificante interno (ITS-1), uma região codificadora de rRNA 5,8S, um outro espaçador não-codificante interno (ITS-2), uma região codificadora de rRNA 28S e, finalmente, um segmento intergênico espaçador não-transcrito, IGS (MATEUS et al., 2006).

Apesar do baixo número de cópias do rDNA em comparação ao kDNA, suas subunidades são bem exploradas no desenvolvimento de ferramentas moleculares para diagnóstico da infecção por *Leishmania*, sendo este alvo um dos mais explorados na identificação de espécies.

2.2.1 Subunidade menor do ribossomo

Os genes codificantes do RNA presente na subunidade menor do ribossomo (SSU-rRNA) apresentam múltiplas cópias e são bem conservados para o gênero em estudo, permitindo o desenho dos iniciadores. Esse alvo não apresenta o problema de heterogeneidade do kDNA, podendo a informação discriminatória do segmento variável ser acessada por sequenciamento ou por hibridação, produzindo resultados positivos pela PCR, independente da linhagem, grupo ou espécie (FLOETER-

WINTER, 2010). Uma desvantagem na aplicação desse alvo é que relações filogenéticas não puderam ser esclarecidas (ULIANA et al., 1991).

Os iniciadores R221, R332, R223 e R333 apresentados por Van Eys et al., 1992, são os mais descritos na amplificação de regiões do SSU-rRNA, produzindo fragmentos de 600 – 650 pb dependendo da espécie de *Leishmania* (SHÖNIAM et al., 2003). Os estudos apontam um desempenho satisfatório desses iniciadores nas PCRs desenvolvidas, ao serem comparados com a pesquisa direta do parasito e sorologia (PIZZUTO et al., 2001; DONCKER et al., 2005; STARK et al., 2006; ANTINORI et al., 2007; SALAM et al., 2009), assim como no monitoramento pós-terapêutico de pacientes imunocomprometidos (LACHAUD et al., 2000, 2001). A Nested-PCR utilizando os pares R221/R332 na primeira reação e R223/R333 na segunda reação detectou 0,01 promastigota (CRUZ et al., 2002). Esta abordagem foi superior às técnicas convencionais em pacientes co-infectados por HIV/*Leishmania* (CRUZ et al., 2002) e em crianças imunocompetentes (CRUZ et al., 2006).

Recentemente, Deborggraeve et al., 2008, desenharam os iniciadores senso 18S-L-F e anti-senso 18S-L-R, que reproduz um fragmento de 115 pb do gen 18S rRNA. A PCR apresentou uma detecção de até 10 fg de DNA, não sendo observadas reações cruzadas com *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma cruzi*. Bhattarai et al., 2010, aplicaram esse sistema na investigação de pacientes assintomáticos que moravam no mesmo domicílio de casos confirmados de calazar, alcançando um excelente desempenho da ferramenta molecular em comparação ao DAT no diagnóstico da infecção por *Leishmania*.

Na análise pela ferramenta primer-BLAST, todos os iniciadores citados para o SSUrRNA podem também amplificar esse alvo em outros tripanossomatídeos, produzindo bandas de tamanho similar aos amplificados com o gênero *Leishmania*. Tal fato pode indicar um problema no uso desse ensaio em áreas co-endêmicas para esses parasitos, podendo resultar, por exemplo, em reação cruzada com doenças de Chagas.

2.2.2. Espaçador interno transcrito

O espaçador interno transcrito (ITS) é uma região não codificante encontrada no SSUrRNA, onde o ITS-1 é delimitado pelos genes 18S e 5.8s, enquanto o ITS-2 pelos genes 5.8S e 28S. Esse espaçador tem sido descrito na identificação de espécies de *Leishmania* e de suas linhagens através da PCR-RFLP (SHÖNIAM et al., 2003). Os pares de iniciadores mais utilizados na amplificação da região ITS são LITSR e L5.8S, que reproduz o ITS-1 com produto de 300 – 350 pb, e LITSV e L5.8SR, para o ITS-2 com produto de 700 pb (EL TAIL et al., 2000; SHÖNIAM et al., 2003). A ITS-1 PCR apresentou bons resultados em amostra de sangue, aspirado de medula ou esfregaços de lâminas coradas com Giemsa (EL TAIL et al., 2000; BADER et al., 2005; KAZEMI-RAD et al., 2008; ALAM et al., 2009; AMRO et al., 2009). Esses iniciadores parecem ser específicos para o gênero *Leishmania*, pois não produz bandas frente a DNA de *T. cruzi*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Typhophywn terrestre* e *Microsporium audouini* (EL TAIL et al., 2000). Porém, utilizando a ferramenta primer-BLAST, observa-se que esses iniciadores podem amplificar regiões de outros tripanossomatídeos, inclusive *T. cruzi*, com produtos que variam de 300 – 760 pb de tamanho.

2.3. Outras regiões-alvo

Os microsatélites são locus polimórficos presentes no DNA nuclear amplamente distribuídos nas células eucarióticas e que apresentam sequências simples repetitivas (SSR), composta por 1 a 4 nucleotídeos, que geralmente não excedem 200 pb (BECKMAN & WEBER, 1992). Rossi et al., 1994, identificaram 3 seqüências de microssatélites no genoma de *Leishmania*: (CA)_n, (GAC)_n e (GGT)_n. Segundo Ferreira e Grattapaglia, 1998, a utilização dessa região em PCR oferece uma completa cobertura do genoma, sendo úteis para mapeamento genético e físico de genomas, identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações. Botilde et al., 2006, compararam o poder discriminatório em nível de zimodema para *L. infantum* de quatro métodos moleculares: kDNAPCR-RFLP, cpb- e gp63PCR-RFLP, tipagem de microssatélite multilocus (MLMT) e amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD). O polimorfismo nos microssatélites é simples e facilmente detectado pela PCR, com boa reprodutibilidade e discriminação, podendo ser usado para diferenciar relapsos ou re-infecção em pacientes com múltiplos episódios de LV (BULLE et al., 2002; OCHSENREITHER et al., 2006; KUHLS et al., 2007; SERIDI et al., 2008).

As *Heat Shock Proteins* (HSPs) ou proteínas do choque térmico são identificadas como os principais imunógenos em várias doenças infecciosas (ARORA et al., 2008), sendo a família da HSP70 comum em soro de pacientes com LV (WALLACE et al., 1992; ARORA et al., 2000). Após mapeamento de HSP70 cDNA (ARORA et al., 1995, 2000), abordagens com PCR foram feitas utilizando os iniciadores *Hsp70sen* e *Hsp70ant* (GARCIA et al., 2004). Um produto de 1300 pb foi amplificado com estes parasitos, o mesmo encontrado com o DNA de *T. cruzi*, mas nenhum produto

foi observado com *M. tuberculosis* ou *Sporothrix schenckii*. Desta forma, falsos positivos podem ser obtidos em pacientes chagásicos.

Arora et al., 2008, desenvolveram uma PCR utilizando os iniciadores desenhados LDS e LDK, amplificando um fragmento de 243 pb do genoma de *L. donovani*. O ensaio obteve uma sensibilidade de 0,5 pg de DNA, aumentando-se para 0,05 pg ao se utilizar uma sonda interna (583—609 bp) no Southern blot. Os autores não observaram ampliações com DNA das espécies *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. aethiopica*, *Entamoeba histolytica*, *M. tuberculosis* e *P. vivax*. Por ser específica para *L. donovani*, o uso dessa PCR pode não ser adequado onde outras espécies são os agentes responsáveis pela LV.

A gp63 é a principal glicoproteína presente na membrana celular de *Leishmania sp*, desempenhando papel fundamental na virulência do parasito e na estimulação da mesma quanto à resposta celular e humoral do hospedeiro (HOYA et al., 1999). Devido ao polimorfismo dessas regiões gênicas, os produtos de amplificação podem ser distintos entre *L. infantum* e *L. donovani*, podendo-se aplicar a identificação de espécies e/ou linhagens pela restrição dos fragmentos (ELAMIN et al., 2008). Os iniciadores SG1/SG2, PDD1/PDD2, TV255 /TV256 foram desenhados para amplificar regiões codificantes dos genes gp63 (GUERBOUJ et al., 2005; TUPPERWAR et al., 2008). Em relação a parasitos humanos, esses iniciadores parecem específicos para o gênero *Leishmania* pela análise pelo primer-BLAST.

Outro alvo estudado recentemente é a região gênica que codifica o antígeno K26, uma proteína hidrofílica de superfície. O par de iniciadores K26f/K26r mostrou-se específico para o complexo *L. donovani*, com produtos que variam de 284 – 1300 pb, discriminando entre *L. infantum* e *L. donovani* (HARALAMBOUS et al., 2008).

Com o par Fme/Rme (MARFURT et al., 2003a), o produto formado é aproximadamente 400 pb para *L. donovani*, porém há amplificação de 400 – 430 pb para outros cinetoplastídeos, como *Crithidia bombi*, *Crithidia lucilia* e *Crithidia fasciculata*, mas nada foi observado para *T. b. rhodesiense*, *T. b. gambiense* e *T. cruzi*.

Fisa et al., 2002, desenvolveram uma Nested-PCR que tem como iniciadores externos o par Ext/E2b e para segunda reação os iniciadores P-I/P-2 (PIARROUX et al., 1993), produzindo fragmento de 100 pb. A Nested-PCR detectou DNA de *Leishmania* em 18% dos pacientes infectados por HIV, cujas culturas foram negativas. Além disso, esta PCR detectou DNA de *Leishmania* nas amostras biológicas 5 a 6 meses antes da cultura ser positiva. Quando testada com células mononucleares e com o *buffy coat* do sangue para transplante, o método molecular foi capaz de identificar um alto número de doadores assintomáticos (SERIN et al., 2005), podendo o sangue ser fonte de infecção para os receptores. Este sistema pode ser utilizado para monitoramento do tratamento, utilizando como amostras biológicas o sangue ou a urina do paciente (RIERA et al., 2004; FISA et al., 2008). A análise pelo BLAST demonstrou a especificidade dessa Nested-PCR para *L. infantum*. Na prática, isso pode dificultar seu uso para diagnóstico de LV por outras espécies do complexo *L. donovani*. Vale ressaltar o pequeno tamanho da banda produzida (100 pb), o que leva a dificuldade de interpretação de resultados.

Os genes nucleares do mini-exon estão presentes nas células do gênero *Leishmania* e em outros cinetoplastídeos, mas ausente nos mamíferos e vetores. Estão presentes nessas células em número de cópias de 100-200 tandem, separados por genes transcritos e não-transcritos. A região transcrita é composta pelo exon altamente conservado com 39 nucleotídeos, e o intron, moderadamente conservado, variando no tamanho entre as espécies do mesmo gênero ou subgênero (FERNANDES et al., 1994; MARFURT et al., 2003b). Utilizando os iniciadores S-1629 e S-1630 para as espécies do complexo *L. donovani*, todas apresentam um produto de aproximadamente 450 pb (KATAKURA et al., 1999). Bons resultados para diferenciação das espécies em amostras clínicas foram alcançados nas pesquisas onde o alvo da RFLP-PCR era a região dos minixons (MARFURT et al., 2003a, 2003b; SERIN et al., 2005). Ao realizar a análise de homologia pela ferramenta primer-BLAST, verificou-se que esses iniciadores amplificam DNA de uma ampla gama de organismo, inclusive *Homo sapiens*. Porém, não foi notificado o seu reconhecimento por DNA de *Leishmania sp*.

4. Conclusão

As abordagens moleculares baseadas em PCR são ferramentas sensíveis e específicas para o diagnóstico da leishmaniose visceral em humanos. Destacamos o poder da PCR em discriminar as espécies de *Leishmania*, o que não é possível pela visualização microscópica do parasito, pesquisa de antígeno ou pela sorologia. Devido a ampla variedade de alvos e iniciadores disponíveis, ainda não há um procedimento “padrão-ouro”, o que dificulta a inserção desse ensaio na rotina dos serviços de saúde. Nosso trabalho aponta quais as vantagens e desvantagens dos principais alvos

moleculares e iniciadores, oferecendo informações para que o profissional possa escolher o sistema de PCR mais adequado a necessidade do seu serviço.

5. Referências

ALAM, M. Z.; SHAMSUZZAMAN, A. K. M.; KUHL, K.; SCHÖNIAN, G. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. *Tropical Medicine International Health*. v.14, n.5. p. 499–503, 2009.

AMRO, A.; AZMI, K.; SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; ALSHARABATI, M. B.; SAWALHA, S.; HAMARSHEH, O.; EREQAT, S.; ABDEEN, Z. Epidemiology of paediatric visceral leishmaniasis in Hebron district, Palestine. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*. v.103, p. 731–736, 2009.

ANDERS, G.; EISENBERGER, C. L.; JONAS, F.; GREENBLATT, C. L. Distinguishing *Leishmania tropica* and *Leishmania major* in the Middle East using the polymerase chain reaction with kinetoplast DNA specific primers. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*. v.96, supl.1, p. 87–92, 2002.

ANDRESEN, K.; GASIM, S.; ELHASSAN, A. M.; KHALI, E. A. G.; BARKER, D. C.; THEANDER, T. G.; KHARAZM, A. Diagnosis of visceral leishmaniasis by the polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymph node samples from patients from the Sudan. *Tropical Medicine International Health*. v. 2, n. 5, p. 440-444, 1997.

ANTINORI, S.; CALATTINI, S.; LONGHI, E.; BESTETTI, G.; PIOLINI, R.; MAGNI, C.; ORLANDO G.; GRAMICCIA M.; ACQUAVIVA V.; FOSCHI A.; CORVASCE S.; COLOMBA C.; TITONE L.; PARRAVICINI C.; CASCIO A.; CORBELLINO M. Clinical Use of Polymerase Chain Reaction Performed on Peripheral Blood and Bone Marrow Samples for the Diagnosis and Monitoring of Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected and HIV Uninfected Patients: A Single-Center, 8-Year Experience in Italy and Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases*. v. 44, p. 1602–1610, 2007.

ARORA, S. K.; MELBY, P. C.; SEHGAL, S. Lack of serological specificity of recombinant heat shock protein 70 of *Leishmania donovani*. *Immunology and Cell Biology*. n.73, p. 446–451, 1995.

ARORA, S. K.; KAUR, D.; SEHGAL, S.; DATTA, U. Identification of sero-specific epitope of recombinant heat shock protein (HSP70) of *Leishmania donovani*. *Journal of Parasitic Disease*. v. 24, p. 21–26, 2000.

ARORA, S. K.; GUPTA, S.; BHARDWAJ, S.; SACHDEVA, N.; SHARMA, N. L. An epitope-specific PCR test for diagnosis of *Leishmania donovani* infections. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*. v. 102, p. 41–45, 2008.

ASSIS, T. S. M.; CALIGIORNE, R. B.; ROMERO, G. A. S.; RABELLO, A. Detection of *Leishmania* kDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*. v. 103, p.1269–1272, 2009.

ATTAR Z. J.; CHANCE M. L.; EL-SAFI S.; CARNEY J.; AZAZY A.; EL-HADI M.; DOURADO C.; HOMMEL M. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Tropica*. v. 78, n.1, p.11-16, 2001.

BADER, K. A.; SCHNUR, L. F.; NASEREDDIN, A.; PRATLONG, F.; DEDET, J.; SHAHEEN, L.; YOUSEF, O.; GREENBLATT, C.L. Short Communication: Palestinian infantile visceral leishmaniasis caused by a genetic variant of *Leishmania infantum* belonging to a new zymodeme. *Tropical Medicine and International Health*. v.10, n.6, p. 618–620, 2005.

BECKMAN, J. S.; WEBER, J. L. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*. v.12, n. 4, p. 627-631, 1992.

BHATTARAI, N. R.; AUWERA, G. V.; KHANAL, B.; DONCKER, S.; RIJAL, S.; DAS, L. M.; URANW S.; OSTYN B.; PRAET N.; SPEYBROECK N.; PICADO A.; DAVIES C.; BOELAERT M.; DUJARDIN J. C. PCR and direct agglutination as *Leishmania* infection markers among healthy Nepalese subjects living in areas endemic for Kala-Azar. *Tropical Medicine and International Health*. v. 14, n. 4, p. 404–411, 2009.

- BHATTARAI, N. R.; DUJARDIN, J. C.; RIJAL, S.; DE DONCKER, S.; BOELAERT, M.; VAN DER AUWERA, G. Development and evaluation of different PCR-based typing methods for discrimination of *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Parasitology*. v. 29, p. 1-11, 2010.
- BOTILDE, Y.; LAURENT, T.; TINTAYA, W. Q.; CHICHARRO, C.; CAÑAVATE, C.; CRUZ, I.; KUHL, K.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infection, Genetics and Evolution*. v. 6, p. 440–446, 2006.
- BRENIÈRE, S. F.; TELLERIA, J.; BOSSENO, F.; BUITRAGO, R.; BASTRENTA, B.; CUNY, G.; BANULS, A.L.; BREWSTER, S.; BARKER, D.C. Polymerase chain reaction-based identification of New World *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes. *Acta Tropical*. v. 73, p. 283–293, 1999.
- BRUSTOLONI, Y. M.; LIMA, R. B.; CUNHA, R. V.; DORVAL, M. E.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. L. L.; PIRMEZ, C. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 102, n. 4, p. 497-500, 2007.
- BULLE, B.; MILLON, L.; BART, J.; GÁLLEGO, M.; GAMBARELLI, F.; PORTÚS, M.; SCHNUR, L.; JAFFE, C. L.; FERNANDEZ-BARREDO, S.; ALUNDA, J. M.; PIARROUX, R. Practical Approach for Typing Strains of *Leishmania infantum* by Microsatellite Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 40, n.9, 3391–3397, 2002.
- CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. v. 98, p.12–17, 2004.
- CORTES, S.; MAURICIO, I.; ALMEIDA, A.; CRISTOVÃO, J. M.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; CAMPINO, L. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitology International*. v. 55, p.277–283, 2006.
- CORTES, S. J. C. Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal. 2008. 163 p. Tese (Doutorado). Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- CRUZ, I.; CAÑAVATE, C.; RUBIO, J. M.; MORALES, M. A.; CHICHARRO, C.; LAGUNA, F.; JIMÉNEZ-MEJÍAS, M.; SIRERA, G.; VIDELA, S.; ALVAR, J.; Spanish HIV-*Leishmania* study group. Nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency Virus. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. v.96, supl.1, p.1185-1189, 2002.
- CRUZ, I.; CHICHARRO, C.; NIETO, J.; BEGONA, B.; CAÑAVATE, C.; FIGUERAS, M. C.; ALVAR, J. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*. v.44, n.7, p.2343–2347, 2006.
- DEBORGGRAEVE, S.; BOELAERT, M.; RIJAL, S.; DONCKER, S.; DUJARDIN, J.; HERDEWIJN, P.; BÜSCHER, P. Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical visceral leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease. *Tropical Medicine and International Health*. v.13, n.11, p.1378–1383, 2008.
- DENIAU, M.; CAÑAVATE, C.; FARAUT-GAMBARELLI, F.; MARTY, P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. v.97, n.1, supl.1, p. 15–33, 2003.
- DISCH, J.; CALIGIORNE, R. B.; MACIELA, F.; OLIVEIRA, M. C.; ORSINIA, M.; DIAS-NETO, E.; RABELLO, A. Single-step duplex kDNA-PCR for detection of *Leishmania donovani* complex in human peripheral blood samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v.56, p. 395–400, 2006.
- DONCKER, S.; HUTSE, V.; ABDELLATI, S.; RIJAL, S.; KARKI, B. S.; DECUYPERE, S.; JACQUET, D.; RAY, D. L.; BOELAERT, M.; KOIRALA, S.; DUJARDIN, J. A new PCR—ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. v. 99, p. 25—31, 2005.
- DOURADO, Z. F. S.; SILVA, H. D.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rk39). *Revista de Patologia Tropical*. v.36, n.3, p. 205-214, 2007.
- EL TAIL, N.; OSMAN, F.; EL FAR, M.; PRESBEFI, W.; SCHÖNIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter

paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. v.94, p.575-579, 2000.

ELAMIN, E. M.; GUIZANIC, I.; GUERBOUJ, S.; GRAMICCIA, M.; EL HASSAN, A. M.; DI MUCCIO, T.; TAHAE, M. A.; MUKHTAR, M. M. Identification of *Leishmania donovani* as a cause of cutaneous leishmaniasis in Sudan. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. v.102, p.54—57, 2008.

FAKHAR, M.; MOTAZEDIAN, M. H.; HATAM, G. R.; ASGARI, Q.; KALANTARI, M.; Mohebbali, M. Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. v.102, n.7, p. 1–7, 2008.

FERNANDES, O.; MURTHY, V. K.; KURATH, U.; DEGRAVE, W. M.; CAMPBELL, D. A. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Molecular and Biochemical Parasitology*. v.66, p. 261-271,1994.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética*. Editora Embrapa-Brasil, 1998.

FISA, R.; RIERA, C.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; MOLINA, I.; GÁLLEGO, M.; FALCÓN, V.; RIBERA, E.; PORTÚS, M. *Leishmania infantum* DNA detection in urine from patients with visceral leishmaniasis and after treatment control. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v.78, n.5, p.741-744, 2008.

FISA, R.; RIERA, C.; RIBERA, E.; GBLLEGO, M.; PORTTIS, M. A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. v.96, supl. 1, p191-194, 2008.

FISSORE, C.; DELAUNAY, P.; FERRUA, B.; ROSENTHAL, E.; GIUDICE, P.; AUFEUVRE, J.; LE FICHOUX, Y.; MARTY, P. Convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 42, n. 11, p. 5332–5333, 2004.

FLOETER-WINTER, L. M. Descrição e utilização de alvos moleculares para identificação de *Leishmania* por PCR. [online], Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa73_leishmania.htm [capturado em 03 de maio de 2010].

GARCIA, L.; KINDT, A.; BERMUDEZ, H.; LLANOS-CUENTAS, A.; DONCKER, S.; AREVALO, J.; TINTAYA, K. W. Q.; DUJARDIN, J. Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. *Journal of Clinical Microbiology*. v.42, n.5, p. 2294–2297, 2004.

GARCÍA-GARCÍA J. A.; MARTÍN-SÁNCHEZ J.; GÁLLEGO M.; RIVERO-ROMÁN A.; CAMACHO A.; RIERA C.; MORILLAS-MÁRQUEZ F.; VERGARA S.; MACÍAS J.; PINEDA, J. Use of noninvasive markers to detect *Leishmania* infection in asymptomatic human immunodeficiency virusinfected patients. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 44, p. 4455-4458, 2006.

GAVGANI, A. M.; KHADEM VATAN, S.; GHAZANCHAEI, A. KAtex antigen-detection test as a diagnostic tool for latent visceral leishmaniasis cases. *African Journal of Biotechnology*. v.7, n.7, p.852-859, 2008.

GERAMIZADEH, B.; FAKHAR, M.; MOTAZEDIAN, M. H. Visceral leishmaniasis with duodenal involvement: three immunocompetent cases from southern Iran. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. v. 100, p.637–640, 2006.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. v. 7, n.3, p.338-349, 2004.

GUERBOUJ, S.; VICTOIR, K.; GUIZANI, I.; SERIDI, N.; NUWAYRI-SALTI, N.; BELKAID, M.; BEN ISMAIL, R.; LE RAY, D.; DUJARDIN, J. C. Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure?, v. 122, p. 25-35, 2001.

HARALAMBOUS, C.; ANTONIOU, M.; PRATLONG, F.; DEDET, J.; SOTERIADOU, K. Development of a molecular assay specific for the *Leishmania donovani* complex that discriminates *L. donovani/Leishmania infantum* zymodemes: a useful tool for typing MON-1. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v.60, p. 33–42, 2008.

HOYA, R. D.; TRUJILLO, C. E.; CARDENAS, C.; PUENTES, F.; PATARROYO, M. E.; MURILLO, L. A. *Leishmania panamensis*: a 44bp Deletion in gp63 Gene is Found in cDNA and Genomic Libraries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 94, n.5, p.641-643, 1999.

- JUNIOR, M. S. C. L.; ANDREOTTI, R.; DORVAL, M. E. M. C.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. G.; MATOS, M. F. C. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.42, n.3, p.303-308, 2009.
- KALLEL K.; AMMARI L.; KAOUECH E.; BELHADJ B.; ANANEB S.; KILANIA B.; CHAKERB E. Asymptomatic bearing of *Leishmania infantum* among Tunisian HIV infected patients. *Pathologie Biologie*. v. 55, p.521-524, 2007.
- KATAKURA, K.; KAWAZU, S.; SANJYOKA, C.; NAYA, T.; MATSUMOTO, Y.; ITO, M.; NAGAKURA K.; AIKAWA M.; HASHIGUCHI Y. *Leishmania* mini-exon genes for molecular epidemiology of leishmaniasis in China and Ecuador. [The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine](#). v. 26, n.3, p.393-399, 1999.
- KAZEMI-RAD, E.; MOHEBALI, M.; HAJJARAN, H.; REZAEI, S.; MAMISHI, S. Diagnosis and characterization of *Leishmania* species in giemsa-stained slides by PCR-RFLP. *Iranian Journal of Public Health*. v.37, n.1, p.54-60, 2008.
- KONGKAEW, W.; SIRIARAYAPORN, P.; LEELAYOOVA, S.; SUPPARATPINYO, K.; AREECHOKCHAI, D.; DUANG-NGERN, P.; CHANACHAI, K.; SUKMEE, T.; SAMUNG, Y.; SRIDURONGKATHUM, P. Autochthonous visceral leishmaniasis: a report of a second case in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. v.38, n.1, p. 8-12, 2007.
- KUHLS, K.; KEILONAT, L.; OCHSENREITHER, S.; SCHAAR, M.; SCHWEYNOCH, C.; PRESBER, W.; SCHÖNIAN, G. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes and Infection*. v.9, p.334-343, 2007.
- KYRIAKOU, D.S.; ALEXANDRAKIS, M. G.; PASSAM, F.H.; KOURELIS, T. V.; FOUNDOULI, P.; MATALLIOTAKIS, E.; MANIATIS, A. N. Quick detection of *Leishmania* in peripheral blood flow cytometry. Is prestorage leucodepletion necessary for leishmaniasis prevention in endemic areas? *Transfusion Medicine*. v.13, p.59-62, 2003.
- LACHAUD, L.; DEREURE, J.; CHABBERT, E.; REYNES, J.; MAUBOUSSIN, J.; OZIOL, E.; DEDET J. P.; BASTIEN P. Optimized PCR Using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *Journal of Clinical Microbiology*. v.38, n.1, p.236-240, 2000.
- LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; REYNES, J.; LAMOTHE, J.; BASTIEN, P. Comparison of Various Sample Preparation Methods for PCR Diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. *Journal of Clinical Microbiology*. v.39, n.2, p.613-617, 2001.
- LAMBSON, B.; SMYTH, A.; BARKER, D. Sequence homology within a minicircle class of the *Leishmania donovani* complex. *Molecular and Biochemical Parasitology*. v.101, p.229-232, 1999.
- LAMBSON, B.; SMYTH, A.; BARKER, D. *Leishmania donovani*: Development and characterisation of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. *Experimental Parasitology*. v.94, p.15-22, 2000.
- LE FICHOUX, Y.; QUARANTA, J. F.; AUFEUVRE, J.; LELIEVRE, A.; MARTY, P.; SUFFIA, I.; ROUSSEAU, D.; KUBAR, J. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in Southern France. *Journal of Clinical Microbiology*. v.37, n.6, p.1953-1957, 1999.
- MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L.; SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Caderno de Saúde Pública*. v.24, n.12, p.2941-2947, 2008.
- MARFURT, J.; NASEREDDIN, A.; NIEDERWIESER, I.; JAFFE, C. L.; BECK, H.; FELGER, I. Identification and Differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the minixon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. v.41, n.7, p.3147-3153, 2003a.
- MARFURT, J.; NIEDERWIESER, I.; MAKIA, N. D.; BECK, H.; FELGER, I. Diagnostic genotyping of old and new World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v. 46, p.115-124, 2003b.

- MARTIN-SANCHEZ, J.; LOPEZ-LOPEZ, M. C.; ACEDO-SANCHEZ, C.; CASTRO-FAJARDO, J. J.; PINEDA, J. A.; MORILLAS-MARQUEZ, F. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. *Parasitology*. v.122, p. 607-615, 2001.
- MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *Journal of Clinical Microbiology*. v.42, n.11, p. 5249–5255, 2004.
- MARY, C.; FARAUT, F.; DROGOUL, M.; XERIDAT, B.; SCHLEINITZ, N.; CUISENIER, B.; DUMON, H. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v.75, n.5, p. 858–863, 2006.
- MATEUS, R. P.; CERON, C. R.; MACHADO, L. P. B.; SENE, F. M. Caracterização preliminar do espaçador interno transcrito-1 its-1 do dna ribossômico nas espécies do *Cluster buzzatii* de *Drosophila* (Diptera: drosophilidae). *Ambiência Guarapuava*. v.2, n.1, p. 89-96, 2006
- MAURYA, R.; SINGH, R. K.; KUMAR, B.; SALOTRA, P.; RAI, M.; SUNDAR, S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assessment of cure. *Journal of Clinical Microbiology*. v.43, n.7, 3038–3041, 2005.
- MONROY-OSTRIA, A.; HERNANDEZ-MONTES, O.; BARKER, D. C. Aetiology of visceral leishmaniasis in México. *Acta Tropical*. v.75, p. 155–161, 2000.
- MORALES, M. A.; CHICHARRO, C.; ARES, M.; CTIAVATE, C.; BARKER, D. C.; ALVAR, J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*. v.95, p. 104- 107, 2001.
- MORALES, M. A.; CRUZ, I.; RUBIO, J. M.; CHICHARRO, C.; CAÑAVATE, C.; LAGUNA, F.; ALVAR, J. Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of Infectious Diseases*. v.185, p.1533–1537, 2002.
- MOTAZEDIAN, M.; FAKHAR, M.; MOTAZEDIAN, M. H.; HATAM, G.; MIKAEILI, F. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v.60, p. 151–154, 2008.
- OCHSENREITHER, S.; KUHL, K.; SCHAAR, M.; PRESBER, W.; SCHÖNIAN, G. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 44, n.2. p.495–503, 2006.
- PIARROUX, R.; AZAIEZ, R.; LOSSI, A. M.; REYNIER, P.; MUSCATELLI, F.; GAMBERELLI, F.; FONTES M.; DUMON H.; QUILICI M. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v.49, n. 3, p. 364-369, 1993.
- PIZZUTO, M.; PIAZZA, M.; SENESE, D.; SCALAMOGNA, C.; CALATTINI, S.; CORSICO, L.; PERSICO, T.; ADRIANI, B.; MAGNI, C.; GUARALDI, G.; GAIERA, G.; LUDOVISI, A.; GRAMICCIA, M.; GALLI, M.; MORONI, M.; CORBELLINO, M.; ANTINORI, S. Role of PCR in Diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 39, p.357–361, 2001.
- RIERA, C.; FISA, R.; UDINA, M.; GÁLLEGO, M.; PORTUS, M. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Transaction of the Royal of Society Tropical Medicine and Hygiene*. v.98, p.102–110, 2004.
- RODRIGUEZ, N. M.; DE GUGLIELMO, Z.; BARRIOS, M. A.; BARRIOS, R. M.; ZERPA, O.; FELICIANGELI, M. D. Genetic homogeneity within *Leishmania (L.) infantum* isolated from human and dogs: the relationship with the sandfly fauna distribution in endemic areas of Nueva Esparta State, Venezuela. *Parasitology*. v. 130, p.611–619, 2005.
- ROLÃO, N.; CORTES, S.; RODRIGUES, O. R.; CAMPINO, L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction–enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Parasitology*. v.90, n.5, p.1150–1154, 2004.
- ROSSI, V.; WINCKER, P.; RAVEL, C.; BLAINEAU, C.; PAGES, M.; BASTIEN, P. Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. *Molecular and Biochemical Parasitology*. v.65, n.2, p.271-282, 1994.

- SALAM, M. A.; MONDAL, D.; KABIR, M.; HAQUE, R. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of kala-azar in an endemic zone of Bangladesh. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. v.25, p.4635 – 4640, 2009.
- SALOTRA, P.; SREENIVAS, G.; POGUE, G P.; LEE, N.; NAKHASI, H. L.; RAMESH, V.; NEGI, N. S. Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*. v.39, n. 3, p.849–854, 2001.
- SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCHA, C.; SCHALLIG, H. D. F. H.; PRESBERA, W.; JAFFEB, C. L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v.47, p.349–358, 2003.
- SERIDI, N.; BELKAID, M.; QUISPE-TINTAYA, W.; ZIDANE, C.; DUJARDIN, J. Application of PCR-RFLP for the exploration of the molecular diversity of *Leishmania infantum* in Algeria. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. v.102, p.556—563, 2008.
- SERIN, M. S.; DAGLIOGLU, K.; BAGIROVA, M.; ALLAHVERDIYEV, A.; UZUN, S.; VURAL, Z.; KAYAR B.; TEZCAN S.; YETKIN M.; ASLAN G.; EMEKDAS G.; KOKSAL F. Rapid diagnosis and genotyping of *Leishmania* isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of miniexon region. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v.53, p.209–214, 2005.
- SHARMA, P.; GURUMURTHY, S.; DUNCAN, R.; NAKHASI, H.L.; SALOTRA, P. Comparative in vivo expression of amastigote up regulated *Leishmania* genes in three different forms of leishmaniasis. *Parasitology International*. v. 59, n. 2, p. 262-264, 2010.
- SMYTH, A. J.; GHOSH, A.; HASSAN, Q.; BASU, D.; DE BRUIJN, M. H. L.; ADHYA, S.; MALLIK, K. K.; BARKER, D. C. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*. v. 105, p. 183-192, 1992.
- SREENIVAS, G.; ANSARI, N. A.; KATARIA, J.; SALOTRA, P. Nested PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in slit aspirates from post-kala-azar dermal leishmaniasis lesions. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 42, n. 4, p.1777–1778, 2004.
- STARK, D.; PETT, S.; MARRIOTT, D.; HARKNESS, J. Post-kala-azar dermal leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a human immunodeficiency virus type 1-infected patient. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 44, n.3, p.1178–1180, 2006.
- SUKMEE, T.; SIRIPATTANAPIPONG, S.; MUNGTHIN, M.; WORAPONG, J.; RANGSIN, R.; SAMUNG, Y.; KONGKAEW, W.; BUMRONGSANA K.; CHANACHAI K.; APIWATHANASORN C.; RUJIROJINDAKUL P.; WATTANASRI, S.; UNGCHUSAK, K.; LEELAYOOVA, S. A suspected new species of *Leishmania*, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. *International Journal of Parasitology*. v.38, p.617–622, 2008.
- SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. v.9, p. 951-958, 2002.
- TELLERIA, J.; LAFAY, B.; VIRREIRA, M.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; SVOBODA, M. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Experimental Parasitology*. v.114, n.4, p.279-288, 2006.
- TUPPERWAR, A. N.; VINEETHB, V.; RATHB, S.; VAIDYA, T. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v.61, p.23–30, 2008.
- ULIANA, S. R.; AFFONSO, M. H.; CAMARGO, E. P.; FLOETER-WINTER, L. M. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. *Experimental Parasitology*. v. 72, p.157-163, 1991.
- VAN EYS, G. J. J. M.; SCHOONE, G. J.; KROON, N. C. M.; EBELING, S. B. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*. v. 51, 133–142, 1992.
- VILLINSKIA, J. T.; KLENAA, J. D.; ABBASSYA, M.; HOELA, D. F.; PUPLAMPUC, N.; MECHTAC, S.; BOAKYE, D.; RACZNIAC G. Evidence for a new species of *Leishmania* associated with a focal disease outbreak in Ghana. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v.60, p. 323–327, 2008.

WALLACE, G. R.; BALL, A. E.; MACFARLANE, J.; EL SAFI, S. H.; MILES, M. A.; KELLY, J. M. Mapping of a visceral leishmaniasis-specific immunodominant B-cell epitope of *Leishmania donovani* Hsp70. *Infection and Immunity*. v.60, p.2688—2693, 1992.

6.2 Optimization of single-tube nested PCR for diagnosing visceral leishmaniasis.

Autores:

Maria Almerice Lopes da Silva^{a,1}, almerice_lopes@yahoo.com.br

Cynthia Regina Pedrosa Soares^a, cynthiaregina@msn.com

Rafael Acioli Medeiros^a, rafacioli@hotmail.com

Zulma Medeiros^a, medeiros@cpqam.fiocruz.br

Fábio Lopes de Melo^a, fflmelo8@hotmail.com

Instituição que pertencem:

^aLaboratório de Doenças Transmissíveis, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária. Recife/PE – Brasil.
Zip Code: 50.670-420

Endereço para correspondência do autor responsável:

¹ Corresponding author: Avenida José Américo de Almeida, 151, 301 G, Macaxeira. Recife – PE, Brazil. Zip Code: 52090320. Telephone: +55 8121012695 Fax numbers: +55 8121012671.

O artigo foi submetido ao periódico **Experimental Parasitology**, e está formatado de acordo com as normas da revista.

Optimization of single-tube nested PCR for diagnosing visceral leishmaniasis.

Maria Almerice Lopes da Silva^{a,1}, almerice_lopes@yahoo.com.br

Cynthia Regina Pedrosa Soares^a, cynthiaregina@msn.com

Rafael Acioli Medeiros^a, rafacioli@hotmail.com

Zulma Medeiros^a, medeiros@cpgam.fiocruz.br

Fábio Lopes de Melo^a, ffilmelo8@hotmail.com

^aLaboratório de Doenças Transmissíveis, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária.

Recife/PE – Brasil. Zip Code: 50.670-420

¹ **Corresponding author: Avenida José Américo de Almeida, 151, 301 G, Macaxeira. Recife – PE, Brazil. Zip Code: 52090320. Telephone: +55 8121012695 Fax numbers: +55 8121012671.**

Abstract

Conventional nested PCR is a very sensitive and specific method for diagnosing visceral leishmaniasis. However, this type of PCR is notorious for contamination problems relating to passage of the product from the first to the second round. In order to have a PCR method that is just as efficient, but without the risk of contamination, we proposed to optimize a single-tube nested PCR (STNPCR) method. We used the targets of the small subunit ribosomal RNA in the first step and the ribosomal internal transcribed spacer in the second stage. The performance of STNPCR and nested PCR for detecting DNA from *Leishmania chagasi* was compared. For STNPCR, the inner primers were immobilized on the internal interface of the cap by means of adsorption microtubes, and these were made soluble after the first reaction. This procedure eliminated opening the microtube, which could have led to false-positive results through cross-contamination. The detection limit for purified *L. (L.) chagasi* DNA was 1 fg using nested PCR and 10 fg using STNPCR. We also tested the specificity of the system against other parasites, and observed that *Trypanosoma cruzi* DNA was amplified, reaching detection of up to 1 pg. This study not only presents a promising tool for diagnosing visceral leishmaniasis, but also provides a new target to be exploited in diagnosing Chagas disease, either in mono-infection with *T. cruzi*, or co-infection with *Leishmania* spp.

Key-word: PCR, diagnosing, visceral leishmaniasis.

1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a systemic protozoan disease caused by species in the *Leishmania donovani* complex that affects thousands of people worldwide (Schönian et al., 2011). Early diagnosing of VL enables a better prognosis for the patient, because cases have higher mortality when untreated. The methods commonly used for the diagnosis are imperfect, so that even today, achieving a sensitive, specific, simple, rapid and low-cost method remains a challenge (Arora et al., 2008).

Many laboratory assays for diagnosing of VL are available. The gold standard consists of viewing the amastigote form of the parasite through examination of aspirates from lymph nodes, bone marrow or the spleen under a microscope. Although the specificity of microscopy is high, its sensitivity varies depending on the organ examined and the parasite load (Hailu et al., 2005, Silva et al., 2005; Sundar and Rai, 2002). Furthermore, aspiration is an invasive procedure and unsuitable for use in the field (Boelaert et al., 2007).

Immunoassays also have limitations. The indirect fluorescent antibody test (IFAT) has low specificity, presents cross-reactions and requires trained personnel (Brazil, 2006; Sundar and Rai, 2002). The direct agglutination test has good sensitivity and specificity, showing better performance than the IFAT, but it requires equipment such as microtiter plates and micropipettes, well-trained laboratory technicians and regular quality control (Chappuis et al., 2007; Gontijo and Melo, 2004). The rK39 immunochromatographic test (ICT) is considered to be excellent method for field application, but it shows cross-reactivity with malaria, typhoid and tuberculosis (Chappuis et al., 2006).

A latex agglutination test (KAtex) for detecting *Leishmania* antigens in the urine of patients with active VL has recently been introduced by Kalon Biological Ltd (Sarkari et al., 2001). In some studies, this test has shown sensitivity of 68-100% and specificity of approximately 64-100% (Salam et al., 2011; Diro et al., 2007; Sundar et al., 2005; Rijal et al., 2004; El-Safi et al., 2003). KAtex performed better than any other serological test, taking microscopy to be the gold standard. However, a few KAtex-negative results may be found in the cases of parasitologically confirmed VL patients, which could represent a limitation of this test with regard to detecting the low levels of urinary *Leishmania* antigens present in these cases (Salam et al., 2011; El-Safi et al., 2003).

Various PCR systems have been developed to identify *Leishmania* spp, and many targets and primer sequences have been described (Aoun et al., 2009; CRUZ et al., 2006; Disch et al., 2004; Schallig et al., 2001; Lachaud et al., 2000). Many studies have shown excellent correlations between PCR results and parasitological and serological tests, and thus, PCR is an alternative when these tests are negative or indeterminate (Alam et al., 2009; Antinori et al., 2007; Cruz et al., 2006). The nested PCR involves two sets of primers, used in two successive PCR runs, in which the second run has the aim of amplifying a secondary target within the product from the first run (Dupin et al., 2002). However, false positives caused by cross contamination are a particular problem of the nested PCR because of the need to open the reaction tube in order to transfer the "amplicons" that serve as the template for the second amplification step.

A single-tube nested PCR (STNPCR) method was developed by Abath et al. (2002), in which the inner primers are immobilized onto the inside of the microtube cap, thereby reducing the risk of contamination during microtube manipulation. STNPCR has already been standardized for detecting *Schistosoma mansoni* (Abath et al., 2002) *Plasmodium falciparum* (Montenegro et al., 2004) *Yersinia pestis* (Souza et al., 2007) and for identifying dengue virus serotypes (Gomes et al., 2007).

In the present study, we put forward an alternative to nested PCR tests, in which nested PCR is performed in a single step, thus eliminating the step of opening the tube and therefore the risk of contamination, primarily of the first reaction product.

2. Materials and methods

2.1. Genomic DNA preparation

Promastigotes of *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) grown in Schneider's medium and was used to obtain the genomic DNA to assess STNPCR. DNA was extracted from the culture using the GenomicPrep tissue DNA isolation kit (GE Healthcare) in accordance with the manufacturer's instructions. The extracted DNA was quantified by measuring absorbance at 260 nm. A dilution series of standard DNA (0.05 fg–1 ng) was used to evaluate the limit of detection of the system. Two μ L of isolated DNA were added to a PCR mixture described in Table 1.

2.2. Simple-PCR

Two PCR assays were used that amplified different parts of *Leishmania* ribosomal repeats: (i) part of the ssu rRNA gene using primers R221 and R332 (Van Eys et al., 1992); and (ii) ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) separating the genes coding for ssu rRNA and 5.8S rRNA using primers LITSR and L5.8S (El Tai et al., 2001, 2000). Amplification reactions were performed in volumes of 50 μ L. In ssu rRNA PCR, amounts of 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 and 10.0 pmol of primers were tested. The optimum concentration of Mg^{2+} was also evaluated in experiments using varying concentrations of $MgCl_2$ (1.5 - 4.0 mM). In relation to ITS1 PCR, amounts of 25.0 and 50.0 pmol of the primers and concentrations of 1.5, 2.5 and 4.0 mM $MgCl_2$ were tested. Cycling protocols described by Schönian et al. (2003) were followed. Information on primer sequences and specific amplification conditions is given in Table 1. The assays were carried out in triplicate in the same thermocycler Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburger-Germany).

2.3. Two-step Nested-PCR and STNPCR

The inner primers were immobilized onto the surface of the cap microcentrifuge tubes of 0.5 ml by evaporation (at 37 ° C) in 10 mL of a solution containing 50 pmol of each primer in bromophenol blue 1 mg / ml (Abath et al., 2002). To define the optimal ratio inner primer: outer primer set, was diluted 10-factor ranging from 50 to 0.005 pmol of the primer pair R221/R332. Two controls were used, one containing only 50 pmol of inner primer and the other 50 pmol of outer primer. This experiment was performed with 1 ng and 100 pg of DNA from *L. (L.) chagasi*.

The first round of amplification consisted of 15 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 53 °C and 2 min at 72 °C. After a pause of approximately 1 min at 95 °C, the tubes were inverted several times to dissolve the inner primers, and returned to the thermocycler for the second round of amplification consisting of 35 cycles of 40 sec at 95 °C, 45 sec at 53 °C and 1 min at 72 °C, and a final step of 6 min at 72 °C. STNPCR amplification was carried out using the reaction mixture in a final volume of 50 μ L.

2.4. Specificity assay

The specificity test was analyzed using genomic DNAs from *Wuchereria bancrofti*, *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma cruzi* and *Mycobacterium tuberculosis*.

2.5. Electrophoresis

Ten microliters of the PCR products were analyzed on 2.0% agarose gels. Gels were stained with ethidium bromide or Blue-green-fluorescent labeling DNA (LGC Biotechnology, SP, BR). The DNA bands were visualized ultraviolet light transilluminator and photographed.

3. Results

3.1. Simple PCR

In assays using the R221/R332 primers, we found sensitivity of 1 pg with genomic DNA from *L. (L.) chagasi*, with primer quantities greater than 3 pmol. Thus, we chose 5 and 10 pmol for optimization of nested PCR, using 2.5 mM Mg^{2+} . With 2 pmol, we found sensitivity of 10 pg and with 1 pmol, no amplification. Through ITS-1 PCR, using 2.5 mM Mg^{2+} , both with 25.0 and with 50.0 pmol of the inner primers, we found sensitivity of 10 fg.

3.2. Conventional nested PCR and STNPCR

There were no differences in DNA detection from *L. (L.) chagasi* between using 5 pmol and 10 pmol of the R221/R332 primers per reaction for nested PCR, with 50 pmol of LITSR/L5.8S per reaction. Both PCRs achieved a maximum of 1 fg of amplification (Fig.1).

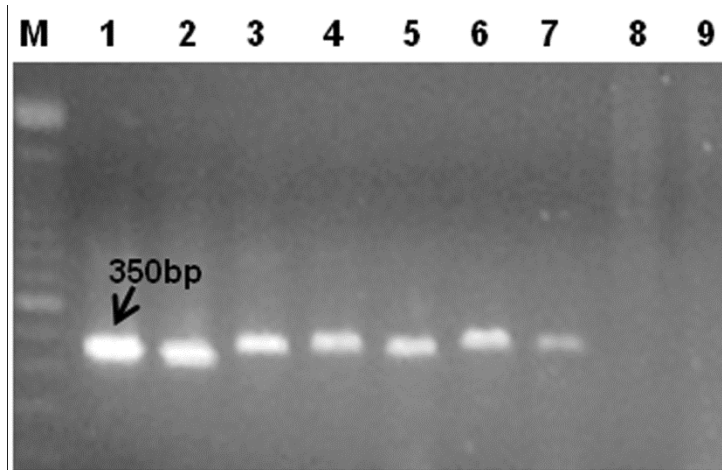


Fig. 1. Nested-PCR (5 pmol/50 μ L of external primers, 50 pmol/50 μ L of internal primers) analysis of ITS1 regions amplified from dilution curve of DNA *Leishmania chagasi*: Lanes 1 – 8: 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 0.1 fg. Lane 9: negative control. M., molecular size (weight) standard.

With STNPCR, the detection limit was 10 fg using 50:2 pmol and 50:3 pmol ratios between the inner and the outer primers. ssu rRNA-PCR did not show any amplification with other organisms. However, when the ITS-1 target was used, a product of approximately 700 bp from the genomic DNA of *T. cruzi* was amplified. A dilution series of standard DNA (0.05 fg to 1 ng) was used to evaluate the detection limit of the system. ITS-1 PCR amplified 100 pg, while the nested PCR amplified up to 1 pg of DNA from *T. cruzi* (Fig. 2).

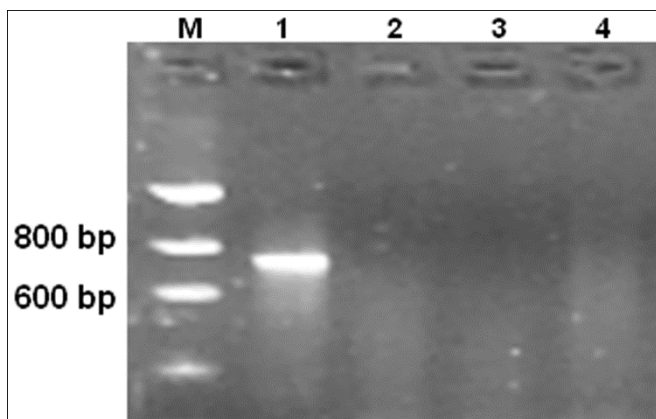


Fig. 2. Nested-PCR analysis: Lane 1: *T. cruzi*. Lane 2: *W. bancrofti*. Lane 3: *S. mansoni*. Lane 4: *M. bacterium*. M., molecular size (weight) standard

4. Discussion

Investment in diagnostic procedures has been identified as necessary for reducing the morbidity and mortality of visceral leishmaniasis, as well as for reducing the risk of transmission (Andrade et al., 2006). PCR is an attractive alternative for

diagnosing VL and is sufficiently sensitive, specific and rapid to meet the needs of control programs. This diagnosis has to meet the needs of traditional diagnostic methods.

The primer pair R221/R332, which was constructed by Van Eys et al.. (1992), has been further reported to provide amplification of ssu rRNA. These primers have produced good results in PCRs that have been developed, in comparison with direct detection of parasites and serological tests (Salam et al., 2009; Antinori et al., 2007; Stark et al., 2006; Doncker et al., 2005; Pizzuto et al., 2001). When we tried to optimize the system using a smaller amount of primer (2-10 pmol), unlike the authors of these protocols, we obtained sensitivity of only 1 pg of genomic DNA from *L. (L.) chagasi*. This modification was aimed at optimizing the STNPCR, because preliminary tests indicated that using 50 pmol of primers in the same solution as the primers of the second round gave rise to interference with PCR performance. The ssu rRNA PCR has been shown to be very sensitive, but can identify *Leishmania* parasites only to the generic and/or subgeneric level (Bensoussan et al., 2006; Disch et al., 2006; Schönian et al., 2003; Lachaud et al., 2002; Van Eys et al., 1992).

Several studies have shown amplification of the ITS-1 region for identifying *Leishmania* spp in bone marrow aspirate or Giemsa-stained smears (Roelfsema et al., 2011; Alam et al., 2009; Amro et al., 2009; Kazemi-Rad et al., 2008; Schönian et al., 2003). This target is the one most commonly used to distinguish Old World *Leishmania* species (Schönian, et al., 2011). However, when the ITS1 PCR is applied to blood and marrow samples, the sensitivity may be diminished through the presence of inhibitors (Schönian et al., 2003). Use of nested PCR composed of two simple PCRs increases the sensitivity and specificity of the assay because the second reaction dilutes potential inhibitors, and amplifies regions that are internal to the product from the first reaction, thus making the test more specific (Dupin et al., 2002). On the other hand, opening the reaction tube to transfer "amplicons" produced in the first step, to the second step PCR, can lead to contamination and thus produce false-positive results. This error greatly impairs disease diagnosis. STNPCR emerged as a means of reproducing the sensitivity and specificity of conventional nested PCR, while eliminating the possibility of contamination of this type (Abath et al., 2002; Liop et al., 2000).

Good results were obtained by applying this molecular approach to inner and outer primers with different annealing temperatures, for diagnosing pathogenic microorganisms (Minarovičová et al., 2009; Bertolini et al., 2003; Gookin et al., 2002). Although this approach greatly limits the sequences that could come to serve as targets for amplification, it enables increased occurrence of nonspecific bands. Another approach would be to physically separate the second-stage reactants from the remaining contents of the reaction tube, by using resins or components foreign to the reaction. Nevertheless, this could interfere with the enzymatic reaction (Tao et al., 2004). Abath et al. (2002) developed a new variant of STNPCR in which the sequestration of inner primers consisted of immobilizing them on the internal interface of the reaction cap. This new form of PCR is simple to perform, reproducible and robust. Thus, this approach was used in our optimization experiments.

In comparing the two optimized nested PCRs, there was no significant difference in detecting the DNA of *L. (L.) chagasi* between the proposed approach (10 fg) and the conventional approach (1 fg), whereas each *Leishmania* spp parasite specimen has 100 fg of DNA (Harris et al., 1998). This result was expected because of the presence of potential Taq DNA polymerase inhibitors in the STNPCR reaction.

However, this is not considered to be an important drawback of the closed-tube reaction, and this is compensated by the minimal risk of carryover contamination.

In the specificity assay, amplification by the primer pair LITSR and L5.8S was detected using genomic DNA from *T. cruzi*. This result was not expected, because other authors have reported negative results in this type of assay (Schönian et al., 2003; El Tai et al., 2000). However, using the primer-BLAST tool, it was observed that these primers were able to amplify regions of other species of the family Trypanosomatidae, including *T. cruzi*, with products ranging from 300 to 760 bp (Silva et al., 2010).

Our results suggest that STNPCR is a promising tool for diagnosing visceral leishmaniasis. This tool now requires standardization and validation with clinical samples. Furthermore, we suggest that this system could be optimized in order to increase its sensitivity for detecting genomic DNA from *T. cruzi*, for possible use on clinical samples from endemic regions, such as areas that are co-endemic with leishmaniasis, thereby aiding in differential diagnosis.

References

- Abath, F.G., Melo, F.L., Werkhauser, R.P., Montenegro, L., Montenegro, R., Schindler, H.C. 2002. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. *BioTechniques*. 33(6), 1210-1214.
- Alam, M.Z., Khair, A., Shamsuzzaman, M., Kuhls, K., Schönian, G. 2009. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. *Trop Med Int Health*. 14(5), 499–503.
- Amro, A., Azmi, K., Schönian, G., Nasereddin, A., M.B., Alsharabati, Sawalha, S., Hamarsheh, O., Erekat, S., Abdeen, Z. 2009. Epidemiology of pediatric visceral leishmaniasis in Hebron district, Palestine. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 103, 731-736.
- Antinori, S., Calattini, S., Longhi, E., Bestetti, G., Piolini, R., Magni, C., Orlando, G., Gramiccia, M., Acquaviva, V., Foschi, A., Corvasce, S., Colomba, C., Titone, L., Parravicini, C., Cascio, A., Corbellino, M. 2007. Clinical Use of Polymerase Chain Reaction Performed on Peripheral Blood and Bone Marrow Samples for the Diagnosis and Monitoring of Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected and HIV Uninfected Patients: A Single-Center, 8-Year Experience in Italy and Review of the Literature. *Clin Infect Dis*. 44, 1602–10.
- Aoun, O., Mary, C., Roqueplo, C., Marie, J., Terrier, O., Levieuge, A., Davoust, B. 2009. Canine leishmaniasis in south-east of France: Screening of *Leishmania infantum* antibodies (western blotting, ELISA) and parasitaemia levels by PCR quantification. *Vet Parasitol*. 166, 27-31.
- Arora, S.K., Gupta, S., Bhardwaj, S., Sachdeva, N., Sharma, N.L. 2008. An epitope-specific PCR test for diagnosis of *Leishmania donovani* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 102, 41-45.
- Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L. F. and Jaffe, C. L. 2006. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 44, 1435–1439.
- Bertolini, E., Penyalver, R., García, A., Olmos, A., Quesada, J., Cambra, M., López, M.M. 2003. Highly sensitive detection of *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* in asymptomatic olive plants by nested-PCR in a single closed tube. *J Microbiol Methods*. 52, 261–266.
- Boelaert, M., Bhattacharya, S., Chappuis, F., El Safi, S.H., Hailu, A., Mondal, D., Rijal, S., Sundar, S., Wasunna, M., Peeling, R.W. 2007. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol*. S30-S39.

- Chappuis, F., Rijal, S., Soto, A., Menten, J., Boelaert, M. 2006. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ*. 7, 333(7571):723.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J., Boelaert, M. 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*. 5(11), 873-882.
- Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J., Cañavate, C., Desjeux, P., Alvar, J. 2006. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res*. 123, 357-388.
- Diro, E., Techane, Y., Tefera, T., Assefa, Y., Kebede, T., Genetu, A., Kebede, Y., Tesfaye, A., Ergicho, B., Gebre-Yohannes, A., Mengistu, G., Engers, H., Aseffa, A., Desjeux, P., Boelaert, M., Hailu, A. 2007. Field evaluation of FD-DAT, rK39 dipstick and KATEX (urine latex agglutination) for diagnosis of visceral leishmaniasis in northwest Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 101, 908-914.
- Disch, J., Caligiorno, R.B., Maciel, 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. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 56, 395-400.
- Disch, J., Oliveira, M.C., Orsini, M., Rabello, A. 2004. Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. *Acta Trop*. 92, 279-283.
- Doncker, S., Hutse, V., Abdellati, S., Rijal, S., Karki, B.S., Decuypere, S., Jacquet, D., Le Ray, D., Boelaert, M., Koirala, S., Dujardin, J. 2005. A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 99, 25-31.
- Dupin, N., Buffet, M., Marcelin, A.G., Lamotte, C., Gorin, I., Ait-Arkoub, Z., Tréluyer, J.M., Bui, P., Calvez, V., Peytavin, G. 2002. HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV-infected patients with lipodystrophy. *AIDS*. 16(18), 2419-2424.
- El Tai, N.O., El Fari, M., Mauricio, I., Miles, M.A., Oskam, L., El Safi, S.H., Presber, W.H., Schönian, G. 2001. *Leishmania donovani*: Intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Exp Parasitol*. 97, 35-44.
- El Tai, N.O., Osman, O.F., El Fari, M., Mauricio, Presber, W.H., Schönian, G. 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 94, 575-579.
- El-Safi, S.H., Abdel-Haleem, A., Hammad, A., El-Basha, I., Omer, A., Kareem, H.G., Boelaert, M., Chance, M., Hommel, M. Field evaluation of latex agglutination test for detecting urinary antigens in visceral leishmaniasis in Sudan. *East Mediterr Health J*. 9(4), 844-855.
- Gomes, A.L.V., Silva, A.M., Cordeiro, M.T., Guimarães, G.F., Marques, E.T.A., Abath, F.G.C. 2007. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers for the identification of dengue virus serotypes. *J Virol Methods*. 145, 76-79.
- Gontijo, C.F.M., Melo, N.M. 2004. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Rev. Bras. Epidemiol*. 7(3), 338-349.
- Gookin, J.L., Birkenheuer, A.J., Breitschwerdt, E.B., Levy, M.G. 2002. Single-Tube Nested PCR for Detection of *Tritrichomonas foetus* in Feline Feces. *J Clin Microbiol*. 40(11), 4126-4130.

- Hailu, A., Mudawi, A., Royce, C., Wasunna, M. 2005. Visceral leishmaniasis: New health tools are needed. *J Pmed.* 2, 590-594.
- Kazemi-Rad, E., Mohebbali, M., Hajjarian, H., Rezaei, S., Mamishi, S. 2008. Diagnosis and characterization of *Leishmania* species in Giemsa-stained slides by PCR-RFLP. *Iranian J Publ Health.* 37(1)54-60.
- Lachaud, L., Dereure, J., Chabbert, E., Reynes, J., Mauboussin, J., Oziol, E., Dedet, J., Bastien, P. 2000. Optimized PCR Using Patient Blood Samples For Diagnosis and Follow-Up of Visceral Leishmaniasis, with Special Reference to AIDS Patients. *J Clin Microbiol.* 38(1), 236-240.
- Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J., Bastien, P. 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 40, 210–215.
- Minarovčová, J., Kaclíková, E., Krascenicsová, K., Siekel, P., Kuchta, T. 2009. A single-tube nested real-time polymerase chain reaction for sensitive contained detection of *Cryptosporidium parvum*. *Lett Appl Microbiol.* 49, 568–572.
- Montenegro, L. M., Montenegro, R.A., Lima, A.S., Carvalho, A.B., Schindler, H.C., Abath, F.G. 2004. Development of a single tube hemi-nested PCR for genus specific detection of *Plasmodium* in oligoparasitemic patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 98(10), 619-625.
- Olmo, S., A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M.T., Terrada, E. 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. *Nucleic Acids Res.* 27(6), 1564-1565.
- Pizzuto, M., Piazza, P., Senese, D., Scalamogna, C., Calattini, S., Corsico, L., Persico, T., Adriani, B., Magni, C., Guaraldi, G., Gaiera, G., Ludovisi, A., Gramiccia, M., Galli, M., Moroni, M., Corbellino, M., Antinori, S. 2001. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Clin Microbiol.* 39, 357–361.
- Rijal, S., Boelaert, M., Regmi, S., Karki, B. M. S., Jacquet, D., Singh, R., Chance, M. L., Chappuis, F., Hommel, M., Desjeux, P., Van der Stuyft, P., Le Ray, D., Koirala, S. 2004. Evaluation of a urinary antigen-based latex agglutination test in the diagnosis of kala-azar in eastern Nepal. *Trop Med Int Health.* 9, 724-729.
- Roelfsema, J.H., Nozari, N., Herremans, T., Kortbeek, L.M., Pinelli, E. 2011. Evaluation and improvement of two PCR targets in molecular typing of clinical samples of *Leishmania* patients. *Exp Parasitol.* 127, 36–41.
- Salam, M.A., Khan, Md.G.M., Mondal, D. Urine antigen detection by latex agglutination test for diagnosis and assessment of initial cure of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 105, 269–272.
- Salam, M.A., Mondal, D., Kabir, M., Haque, R. 2009. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of kala-azar in an endemic zone of Bangladesh. *Pak J Med Sci.* 25(4). 635-640.
- Sarkari, B., Chance, M., Hommel, M. 2001. Antigenuria in visceral leishmaniasis: detection and partial characterisation of a carbohydrate antigen. *Acta Trop.* 82, 339–348.
- Schallig, H.D.F.H., Schoone, G.J., Kroon, C.C.M., Hailu, A., Chappuis, F., Veeken, H. 2001. Development and application of 'simple' diagnostic tools for visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* 190, 69-71.
- Schönian, G., Kuhls, K., Mauricio, I. L. 2011. Molecular approaches for a better understanding. *Parasitology.* 138, 405–425.

- Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H.D.F.H, Presber, W., Jaffe, C.L. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 47 , 349–358.
- Silva, M.A.L., Medeiros, R.A., Brandão-Filho, S., Melo, F.L., Medeiros, Z. 2010. Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Revista Eletrônica de Farmácia.* VII, 1-15.
- Silva, M.R.B., Stewart, J., Costa, C.H. 2005. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 72(6), 811-814.
- Souza, G., Abath, F., Leal, N., Farias, A., Almeida, A. 2007. Development and evaluation of a single tube nested PCR based approach (STNPCR) for the diagnosis of plague. *Adv Exp Med Biol.* 603, 351-359.
- Stark, D., Pett, S., Marriott, D., Harkness, J. 2006. Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patient. *J Clin Microbiol.* 40, 1178–1180.
- Sundar, S., Agrawal, S., Pai, K., Chance, M., Hommel, M. 2005. Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex agglutination test. *Am J Trop Med Hyg.* 73(2), 269-271.
- Sundar, S., Rai, M. 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9, 951–958.
- Tao, S., Jiang, D., Lu, H., Xing, W., Xiang Zhou, Y.X., Cheng, J. 2004. One-tube nested RT-PCR enabled by using a plastic film and its application for the rapid detection of SARS-virus. *Biotechnol Lett.* 26(3), 179-183.
- van Eys, J.J.M., Schoone, G.J., Kroon, N.C.M., Ebeling, S.B. 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol.* 51, 133-142.

6.3 A comparison of four DNA extraction protocols for analysis of urine from patients with visceral leishmaniasis

Four DNA extraction protocols of urine from patients with visceral leishmaniasis

Autores:

Maria Almerice Lopes da Silva^{a,1}

Cynthia Regina Pedrosa Soares^a

Zulma Medeiros^a

Fábio Lopes de Melo^a.

Instituição que pertencem:

^aLaboratório de Doenças Transmissíveis, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Av.

Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária. Recife/PE – Brasil.

Zip Code: 50.670-420.

Endereço para correspondência do autor responsável:

¹ Corresponding author: Avenida José Américo de Almeida, 151, 301 G, Macaxeira. Recife – PE, Brazil. Zip Code: 52090320.

Telephone: +55 8121012695

Fax numbers: +55 8121012671.

O artigo foi submetido ao **Brazilian Journal of infectious Disease**, e se apresenta de acordo com as normas da revista.

A comparison of four DNA extraction protocols for analysis of urine from patients with visceral leishmaniasis

Four DNA extraction protocols of urine from patients with visceral leishmaniasis

Maria Almerice Lopes da Silva^{a,1} Cynthia Regina Pedrosa Soares^a, Zulma Medeiros^a, Fábio Lopes de Melo^a.

^aLaboratório de Doenças Transmissíveis, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Av.

Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária. Recife/PE – Brasil.

Zip Code: 50.670-420

¹ **Corresponding author: Avenida José Américo de Almeida, 151, 301 G, Macaxeira. Recife – PE, Brazil. Zip Code: 52090320. Telephone: +55 8121012695 Fax numbers: +55 8121012671.**

Abstract

Obtaining a good quantity of high quality genomic DNA is a crucial step for successful amplification using the polymerase chain reaction (PCR) and, therefore, for research and diagnostic testing. A comparative performance evaluation was carried out of methods for extracting DNA from urine of the individuals with leishmaniasis visceral using various protocols, to determine which produces the best quality DNA suitable for PCR amplification. Two commercially available extraction kits and two in-house DNA extraction methods for the release of DNA from *Leishmania infantum chagasi* in urine were assessed for sensitivity, purity, duration and cost. All commercially available kits helped to shorten the duration of DNA extraction. The *QIAamp DNA Mini Kit* was the commercially available assay that yielded the same sensitivity and purity of *Leishmania* DNA release as the in-house protocol but was the most expensive method. Our results suggest that differences exist between

methods for extracting DNA from urine, and this should be considered when assessing the parasite rate blood and determining the clinical profile of the individual.

Keywords: Urine, extraction, DNA, leishmaniasis.

1. Introduction

Visceral leishmaniasis is endemic in 62 countries in tropical and subtropical regions, with 500,000 new cases reported annually, of which 90% are in India, Sudan, Bangladesh and Brazil(1). The common symptORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE are fever, weight loss, hepatomegaly, splenomegaly, hypergammaglobulinaemia and pancytopenia. If untreated, it is fatal in 90% of cases (2).

In resolution WHA60.13 on control of leishmaniasis the Health Assembly, urged Member States to strengthen prevention, active detection and treatment of cases of visceral leishmaniasis in order to reduce the burden of the disease(3). However, an effective diagnosis for detection of cases is not yet available. The original techniques for demonstrating amastigotes in smears of spleen, bone marrow and lymph nodes aspirates for diagnosis are still the standard methods (4). Nevertheless, these techniques require strict precautions, training and technical expertise, which complicates its application for routine and field studies(5–7). The sero-diagnoses are not ideal because they do not discriminate between disease and asymptomatic infection, and are susceptible to cross-reactions (8,9).

PCR might be an alternative option when the clinical signs and symptORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE suggest KA but microscopic scanning and serological tests provide negative results (10). Assays have been standardized in various body fluids, such as blood, bone marrow aspirate, urine and serum(11–15). Urine collection has the advantage of being non-invasive, inexpensive and easy to perform. DNA extraction from urine is compared to extracting it from blood and serum, because of the low protein

content(16). Work describes finding a viable culture of amastigotes in the urine of patients with VL or parts of the parasite, as proteins and DNA(17) or parts of the parasite, as proteins(18–20) and DNA(14,21). The use urine as a sample for PCR has proved to be promising, with a sensitivity of around 88-97% and a specificity of 100%(14,21,22).

For good performance of PCR, it is essential that DNA extraction is effective, producing DNA that is pure and free of inhibitors. The aim of this study was to compare four methods for extracting DNA in urine for PCR analysis.

2. Material and Methods

2.1. Urine collection

Samples of urine from 11 individuals with natural clinical leishmaniasis diagnosed by bone marrow aspirate were studied. 50–60 mL of urine were collected for each specimen in a Falcon tube with EDTA to obtain a final concentration of 10 mM. Urine specimens were stored at –50°C. The study was approved by the *Human Research Ethics Committees* of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

2.2. Detection Limit

Promastigotes of *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) were grown in Schneider's medium and used to obtain the genomic DNA. DNA was extracted from the culture using the GenomicPrep tissue DNA isolation kit (GE Healthcare) in accordance with the manufacturer's instructions. The DNA was quantified by measuring absorbance at 260 nm. The detection limit of the protocols started the preparation of the urine with a known concentration of genomic *L. (L.) chagasi* DNA. Urine samples from healthy parasite-negative donors were used in this preparation. These urine samples were also used as negative controls and collected as described above. The final concentrations were 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 e 0.1 pg of DNA *L. (L.) chagasi* / μ L of urine.

2.3. DNA extraction protocols

Four extraction protocols, using two commercial kits, the *QIAamp DNA Mini Kit* (*QUIAGEN*) and the *illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit* (*GE*) and two methods based on proteinase K digestion, were evaluated for their capacity to extract DNA. All the experiments were carried out in duplicate.

a) Proteinase K digestion in a lyses buffer was followed by phenol-chloroform extraction

Protocols 1 and 2 were based on solvent extraction using phenol: chloroform, with the difference between them being the precipitation of suspended solids, including DNA molecules, using ethanol and the volume concentration of the sample in a microtube (protocol 2).

Protocol 1: 5 mL of urine, 600 μ L of lyse solution (NaCl 100 mM, TrisHCl 10 mM, SDS 0.5%, pH 8.0) and 40 μ L of Proteinase K (20 mg/mL) were added to Falcon tube at 60 °C for 1 h. After incubation, an equal volume of buffer-saturated phenol was added to the DNA solution. The samples were centrifuged at 5000 rpm /7min in accordance with all the following steps. The aqueous layer was carefully removed and placed in a new tube. An equal volume of Buffer-saturated phenol: chloroform (1:1) was added to the aqueous layer. After centrifugation and removal of the aqueous layer, an equal volume of chloroform was added to the aqueous layer to remove traces of phenol. This step was repeated twice. An equal volume of isopropyl alcohol was added to the aqueous layer. After centrifugation, the supernatant was discarded and the pellet was washed with 70% ethanol, centrifuged and dried at room temperature. The pellet was resuspended in 20 μ L of autoclaved *Milli-Q water*.

Protocol 2: Five mL of each sample was transferred to a 15 mL Falcon tube. Absolute ethanol, at a quantity of two times the sample volume, was added, and samples were centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The supernatant was discarded and 700 μ L of lyse buffer and 20 μ L of Proteinase K (20 mg/mL) were added to the pellet. After incubation (1 h at 60°

C), the DNA solution was transferred to a microtube where DNA extraction was carried out using the phenol-chloroform method. In this protocol 2, the samples were centrifuged at 11 000 rpm /1min for all steps, except for the isopropyl alcohol step where they were centrifuged at 11000 rpm for 3 min. The pellet was resuspended in 20 μ L of autoclaved *Milli-Q water*.

b) Commercial Kits

The *QIAamp DNA Mini Kit (QUIAGEN)* (Protocol 3) and *Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE) (Protocol 4)* were used in accordance with the manufacturer's instructions.

2.4. PCR assay

The DNA extracted was amplified using primers RV1 and RV2 (Le Fichoux, *et al.*, 1999). The reaction mixture (25 μ L) was prepared containing a buffer of 1X Invitrogen, 0.25 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 units Taq polymerase (Invitrogen), 2 μ L DNA, 25 pmol of each primer, RV1 (5'- CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG) and RV2 (5'- CACCTGGCCTATTTTACACCA), to amplify the conserved fragment of minicircle kDNA of *Leishmania*. After an initial denaturation (5 min at 94°C), 35 cycles (denaturation, 30 sec at 94°C; annealing, 1 min at 67°C; polymerization, 30 s at 72°C) were carried out, and PCR was concluded by a final extension at 70°C for 10 min. DNA amplification was performed in a thermocycler Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburger-Germany). In all reactions included a positive and a negative control. The expected final product was 145 bp. The amplification products were visualized after electrophoresis on 2% agarose gel containing ethidium bromide.

2.5. Calculation of cost and time of extraction

The cost per test was calculated for each system. The time taken to complete the steps in each protocol was estimated for each sample in minutes.

3. Results

3.1. Detection limit, cost and time of extraction protocols

The detection limit for purified *L. (L.) chagasi* DNA was 0.4 pg using Protocol 1 and 0.2 pg using Protocol 2. Despite the small difference between the detection limits, changes in Protocol 2 improved the performance and yield of extraction using phenol: chloroform, appearing as more intense bands (Fig. 1), and incur lower costs (Table 1). Because the best results were provided by Protocol 2, this protocol was chosen for DNA extraction from *L. (L.) chagasi* in the urine of patients with visceral leishmaniasis.

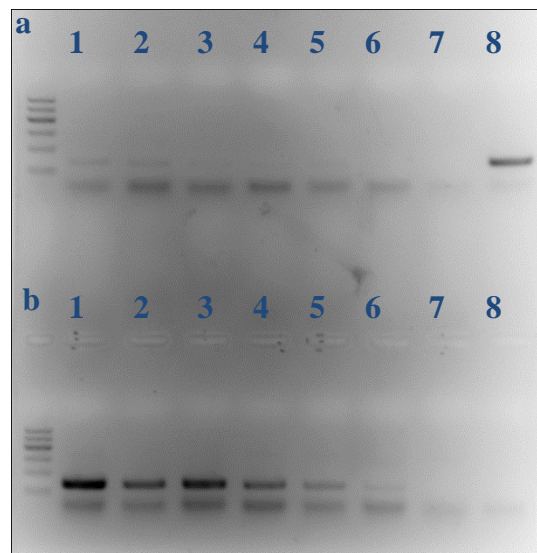


Fig.1. Products of amplification after extractions using protocol 1 (a) and protocol 2 (b). Lines 1 – 6: 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 and 0.1 pg of DNA *L. (L.) chagasi* / μ L. Lines 7: negative control of the extraction. Line 8a: positive control of PCR. Line 8b: negative control of PCR.

Table 1. Comparison of the four protocols for DNA extraction in urine

| Protocol | Cost/sample (US\$) | Total process time (min) | Sample size | Detection limit (pg of DNA) |
|------------|-----------------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|
| Protocol 1 | 19.00 | 110 | 5 mL | 0.2 |
| Protocol 2 | 1.75 | 75 | 5 mL | 0.1 |
| Protocol 3 | 5.20 | 25 | 200 μ L | 0.1 |
| Protocol 4 | 2.25 | 40 | 200 μ L | No product |

The *QIAamp DNA Mini Kit (QUIAGEN)* also performed well in terms of the detection limit for extracting DNA from urine, since the PCR products could be visualized at all concentrations of DNA tested (Figure 2). This protocol requires a lower volume of sample compared to Protocols 1 and 2 and is the fastest protocol tested. However, it is also the most expensive (Table 1). No amplification was observed using the illustra Spin Blood Mini Kit genomicPrep (GE). Nevertheless, the kit was tested with the samples from patients with visceral leishmaniasis.

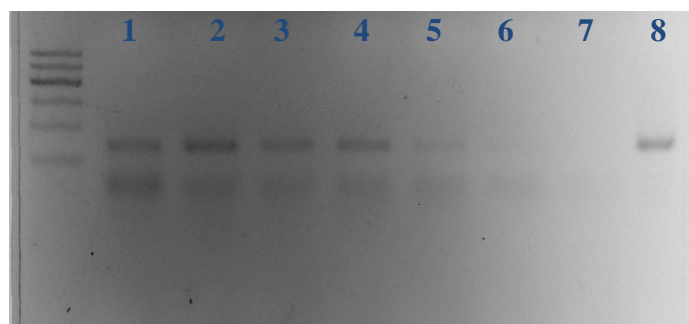


Fig.2. Products of amplification after extractions using protocol 3. Lines 1 – 6: 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 and 0.1 pg of DNA *L. (L.) chagasi* / μ L of urine. Lines 7: negative control of the extraction. Line 8: positive control of PCR.

3.2. Application of the four protocols to detection of *L. (L.) chagasi* in patients' urine.

Protocols 2, 3 and 4 were tested using urine samples from 11 patients testing positive for the parasite. Protocol 2 detected DNA *L. (L.) chagasi* in 8 urine samples, while Protocols 3 and 4 detected DNA in four each (Table 2). Only one sample tested positive using all three protocols.

Table 2. Amplification of products using kDNAPCR for the four extraction protocols tested on urine

| Sample | Protocol 2 | Protocol 3 | Protocol 4 |
|-----------|------------|------------|------------|
| 1 | + | + | - |
| 2 | + | - | + |
| 3 | + | - | - |
| 4 | + | + | + |
| 5 | - | + | + |
| 6 | + | - | - |
| 7 | + | - | - |
| 8 | - | + | - |
| 9 | + | - | - |
| 10 | - | - | + |
| 11 | + | - | - |

+: presence of amplifications, - : absence of amplifications.

4. Discussion

Several advantages can be described for the use of urine as the source of DNA in diagnostic PCR. The collection of biological fluid is practical, noninvasive and low cost. Fisa *et al.*(14) describe PCR with urine as a simple technique for the diagnosis of LV during the

acute phase, similar to the performance of urinary antigen and PCR in blood and blood cultures. However, it should be considered that the urine is a dilute sample containing potential inhibitors of PCR such as urea and nitrites(23). Furthermore, the DNA may be degraded by endonucleases bacteria present in urine(24,25). The DNA extraction is thus a decisive step towards achieving the outcome of PCR, given that its aim is to recover DNA and eliminate the potential PCR inhibitors present in the sample. It is more likely that degradation of DNA in urine occurs as a result of nucleases present in the fluid(26). In studies investigating cell-free transrenal DNA, that is, DNA from the bloodstream that has passed the kidney barrier, urine is collected and immediately mixed with EDTA to a final concentration of 10 mM EDTA to inhibit the action of nucleases. EDTA is a chelating agent that sequesters metal ions. These are found in high concentrations in urine and can interfere with the PCR (27).

In evaluating the detection limits, both extraction using phenol: chloroform and the QIAamp DNA Mini Kit (QUIAGEN) provided good results for DNA extracted from a parasite smaller than *L. (L.) chagasi*. Other authors have described the efficiency of the methods in removing PCR inhibitors(21,28,29). However, in our study, Protocol 2 performed better than Protocol 3, when tested on urine samples from subjects with VL, with a greater number of positive samples using PCR. The extraction method involving the solvents, phenol and chloroform, is still widely used in research and diagnostics. We here propose two modifications: the introduction of precipitation with ethanol prior to extraction rather than the conventional method and the reduction of the initial volume of the biological material. These changes lead to improved extraction performance, which was identified by the greater intensity of the products produced. Protocol 2 makes it possible to work with a larger volume of urine (5 mL) than Protocol 3, without having to use high cost solvents. This greater volume increases the likelihood of finding DNA in the fluid, which may have given rise to the

difference between these two protocols in terms of the number of urine samples testing positive using PCR. The introduction of precipitation with ethanol prior to extraction may also have contributed to the satisfactory performance of Protocol 2. Although it is more inexpensive compared to commercial kits, this method is inconvenient because it takes the longest to run and uses toxic solvents, thus requiring the use of an adequate space for handling these.

In the present study, the commercial kits did not perform so well when evaluated using urine samples from patients. In spite of the poor performance of the GE kit on the detection limit test, it was able to purify DNA in a urine sample from subjects with LV where other protocols failed. It is worth noting that manufacturers' recommendations do not include the use of urine. However, as it is a kit widely used for obtaining DNA from various biological samples with good results (unpublished data), we decided to evaluate its performance with urine. Differences between the results for the kits in terms of the detection limit and samples testing positive show that the attempt to replicate the conditions of the body cannot always simulate natural conditions. Validation using a larger number of positive samples is required for robustness of the results.

PCR is still seen as an expensive technique by some services and health professionals. In the present study, however, the best method for extraction was also the cheapest, costing US \$ 1.75 per sample. A study conducted by Dourado et al., (30), which evaluated the cost per diagnosis, found that spending on immunochromatography was \$ 2.71, while the cost of parasitological diagnosis is higher than U.S. \$ 72.10, because it requires a qualified medical practitioner, anesthesia and specific materials to perform the bone marrow or viscera aspirate. Serology by IFA would cost U.S. \$ 8.56. Given these data, we question whether really the PCR is a technique with a high cost.

Our results thus provide further support for the possible deployment of PCR as a diagnostic tool for LV, using urine as a non-invasive source of DNA and providing an alternative diagnosis at low cost. Nevertheless, further studies are needed to better characterize the use of urine PCR for diagnosis of VL in post-treatment follow-up in and to report results relating to the prognosis and evolution of the disease.

References

1. Pavli A, Maltezou HC. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *Int J Med Microbiol.* 2010; 14(12):e1032–9.
2. Maia-elkhoury ANS, Sena JMD. Visceral leishmaniasis in Brazil : trends and challenges. *Cad. Saúde Pública.* 2008;24(12):2941–7.
3. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION SIXTIETH WORLD HEALTH ASSEMBLY. 2007;(May):14–23.
4. Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Magni C, et al.. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review . *Clin Infect Dis.* 2007;44(12):1602–10.
5. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(5):951–8.
6. Hailu A, Musa AM, Royce C, Wasunna M. Visceral leishmaniasis: new health tools are needed. *PLoS medicine.* 2005;2(7):e211.
7. Silva ES, Gontijo CMF, Melo MN. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends Parasitol.* 2005;21(12):550–2.
8. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol.* 2004;7(3):338–49.
9. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al.. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(11):873–82.
10. Alam MZ, Shamsuzzaman AKM, Kuhls K, Schönian G. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. *Trop Med Int Health.* 2009;14(5):499–503.
11. Andresen K, Gasim S, Elhassan a M, Khalil E a, Barker DC, Theander TG, et al.. Diagnosis of visceral leishmaniasis by the polymerase chain reaction using blood, bone

- marrow and lymph node samples from patients from the Sudan. *Trop Med Int Health*. 1997 May;2(5):440–4.
12. Disch J, Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. *Acta Trop*. 2004;92(3):279–83.
 13. Agrawal S, Rai M, Sundar S. Management of visceral leishmaniasis: Indian perspective. *J Postgrad Med*. 2005;51 Suppl 1:S53–7.
 14. Fisa R, Riera C, López-Chejade P, Molina I, Gállego M, Falcó V, et al.. *Leishmania infantum* DNA detection in urine from patients with visceral leishmaniasis and after treatment control. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78(5):741–4.
 15. Srivastava P, Mehrotra S, Tiwary P, Chakravarty J, Sundar S. Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. *PloS one*. 2011;6(4):e19304.
 16. Su Y-H, Wang M, Brenner DE, Ng A, Melkonyan H, Umansky S, et al.. Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer. *J Mol Diagn*. 2004;6(2):101–7.
 17. Mebrahtu YB, Hendricks LD, Oster CN, Lawyer PG, Perkins PV, Pamba H, et al.. *Leishmania donovani* parasites in the nasal secretions, tonsillopharyngeal mucosa, and urine centrifugates of visceral leishmaniasis patients in Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;48(4):530–5.
 18. Kohanteb J, Ardehali SM, Rezai HR. Detection of *Leishmania donovani* soluble antigen and antibody in the urine of visceral leishmaniasis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81(4):578–80.
 19. Attar ZJ, Chance ML, el-Safi S, Carney J, Azazy a, El-Hadi M, et al.. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Trop*. 200;78(1):11–6.
 20. Riera C, Fisa R, Udina M, Gállego M, Portus M. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004;98(2):102–10.
 21. Motazedian M, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam G, Mikaeili F. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;60(2):151–4.
 22. Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, et al.. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2007;147(3-4):315–9.
 23. Khan G, Kangro HO, Coates PJ, Heath RB. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *J Clin Pathol*. 1991;44(5):360–5.

24. Milde A, Haas-Rochholz H, Kaatsch H-J. Improved DNA typing of human urine by adding EDTA. *Int J Legal Med.* 1999;112(3):209–10.
25. Carder C, Robinson AJ, Broughton C, Stephenson JM, Ridgway GL. Evaluation of self-taken samples for the presence of genital *Chlamydia trachomatis* infection in women using the ligase chain reaction assay. *Int J STD AIDS.* 1999;10(12):776–9.
26. Brinkman J a, Rahmani MZ, Jones WE, Chaturvedi AK, Hagensee ME. Optimization of PCR based detection of human papillomavirus DNA from urine specimens. *J Clin Virol.* 2004;29(4):230–40.
27. Behzadbehbahani a, Klapper PE, Vallely PJ, Cleator GM. Detection of BK virus in urine by polymerase chain reaction: a comparison of DNA extraction methods. *J Virol Methods.* 1997 Oct;67(2):161–6.
28. Bergallo M, Costa C, Gribaudo G, Tarallo S, Baro S, Negro Ponzi A, et al. Evaluation of six methods for extraction and purification of viral DNA from urine and serum samples. *New Microbiol.* 2006 May;29(2):111–9.
29. García Moreira V, Prieto García B, de la Cera Martínez T, Alvarez Menéndez FV. Elevated transrenal DNA (cell-free urine DNA) in patients with urinary tract infection compared to healthy controls. *Clin Biochem.* 2009;42(7-8):729–31.
30. Dourado Z. Panorama histórico Do diagnóstico laboratorial DA leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (RK39). *Revista de Patologia Tropical.* 2008;36(3):205–14.

6.4 Avaliação de três alvos moleculares para o diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue, soro e urina.

Autores:

Maria Almerice Lopes da Silva¹

Cynthia Regina Pedrosa¹

Zulma Medeiros¹

Fábio Lopes de Melo¹

Instituição que pertencem:

¹ Laboratório de Doenças Transmissíveis, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Av.

Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária. Recife/PE – Brasil.

Zip Code: 50.670-420.

Endereço para correspondência do autor responsável:

Maria Almerice Lopes da Silva: Avenida José Américo de Almeida, 151, 301 G, Macaxeira.

Recife – PE, Brazil. Zip Code: 52090320.

Telephone: +55 8121012695

Fax numbers: +55 8121012671.

Esse artigo traz dados preliminares sobre a aplicação dos sistemas de PCR desenvolvidos em amostras biológicas. No momento da publicação da tese, o referido documento não tinha sido enviado para publicação.

Avaliação de três alvos moleculares para o diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue, soro e urina.

Resumo

O objetivo desse estudo foi comparar sensibilidade e especificidade de diferentes métodos de PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral usando sangue, soro e urina. Três PCR simples foram comparadas utilizando os seguintes alvos: kDNA, ssu rRNA e ITS-1. Uma nested-PCR, utilizando na primeira reação o alvo ssu rRNA e, na segunda reação, ITS-1, também foi avaliada. Primeiramente, os sistemas foram avaliados para limite de detecção, utilizando DNA genômico de *Leishmania infantum*, onde todas atingiram um limite menor que um parasito. Em seguida, foram avaliadas amostras de sangue, soro e urina de 48 indivíduos, 15 com parasitológico positivo e 33 com parasitológico negativo. A kDNAPCR foi a mais sensível (53,33%; IC95%:30,12-75,19) para sangue, e foi a única que conseguiu amplificar DNA de soro (40%;IC95%:19,82-64,25) e urina (71,43%;IC95%:45,35-88,28). Ao utilizar urina, a kDNAPCR foi significativamente mais eficiente do que com sangue (54,17 vs 71,43%, P= 0,002). Sugerimos a validação dessa PCR com urina para implementação dessa ferramenta como uma forma de diagnóstico não invasiva para o paciente.

Palavras chaves: PCR, sangue, soro, urina, diagnóstico, leishmaniose visceral.

1. Introdução

A leishmaniose visceral é uma zoonose amplamente distribuída no mundo, com alta prevalência em países tropicais como o Brasil. Programas de controle para leishmaniose visceral tem sido propostos visando a redução de casos dessa doença e, conseqüentemente, a letalidade. No entanto, para o sucesso desses programas, o diagnóstico precoce e tratamento imediato são essenciais (OPAS, 2007).

Vários sistemas baseados em PCR têm sido desenvolvidos para *Leishmania*, e muitas seqüências alvo já foram identificadas, como também um grande número de “primers”, ou iniciadores, desenhados (SCHALLING et al., 2002). As abordagens de PCR têm encontrado excelente correlação com os resultados obtidos pelas técnicas convencionais de visualização do parasito, independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente (WEISS, 1995).

A PCR tem sido vista como um diagnóstico alternativo quando o paciente apresenta como hipótese diagnóstica leishmaniose visceral ou coinfeção e microscopia e sorologia são

negativas ou indeterminadas (ALAM et al., 2009). Nós propomos aqui avaliar a sensibilidade de quatro PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral, utilizando como fonte de DNA amostras de sangue, soro e urina.

2. Material e métodos

2.1. Obtenção das amostras biológicas

Foram coletados 10 mL de sangue, 5 mL em tubos com EDTA e 5 mL em tubo seco, para separação do soro, mantidos sob refrigeração até chegarem ao laboratório onde foi feita a extração de DNA imediatamente. Em relação a urina, foram coletados em torno de 50 mL, em tubo do tipo Falcon ao qual foi adicionado EDTA para concentração final de 10 mM. Quando não foi possível o processamento imediato da amostra, essa foi armazenada a -70° C até a realização da extração.

Quarenta e oito indivíduos participaram do estudo, após assinarem termo de consentimento. Desses, 15 possuíam parasitológico positivo e 33 com parasitológicos negativos pelo aspirado de medula óssea. Ao total, foram analisadas 48 amostras de sangue, 44 amostras de soro e a 42 amostras de urina. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. A extração de DNA do sangue e do soro foi realizada com o kit comercial “illustraTM blood genomicPrep mini spin kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Para a extração em urina, foi utilizado o método fenol-clorofórmio com algumas modificações (dados submetidos).

2.2. Determinação do limite de detecção

Cepas de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) cultivadas em meio de cultura Schneider foram usadas para obtenção do DNA genômico. A extração foi feita com o kit comercial “illustraTM tissue & cells genomicPrep mini spin kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). A quantificação do DNA extraído do parasito foi medida pelo espectrofotômetro Ultrospec 3000 UV/Visible, Pharmacia Biotech. Para definição do limite de detecção foi construída uma curva de calibração a partir de quantidades conhecidas de DNA genômico purificado de *L. infantum*, com o objetivo de avaliar a quantidade mínima de DNA que os sistemas de PCRs eram capazes de amplificar. Foram feitas diluições de fator 10, seriadas, que resultaram nas seguintes concentrações (0,5 ng/ μ L, 50 pg/ μ L, 5 pg/ μ L, 500 fg/ μ L, 50 fg/ μ L, 5 fg/ μ L, 0,5 fg/ μ L, 0,005 fg/ μ L, 0,0005 fg/ μ L). Dois 2 μ L de cada diluição foram adicionados nas reações.

2.3. PCR

a) ssu rRNA-PCR: os primers utilizados foram R221 (5' GGTTCCTTTCCTGATTTACG) e R332 (5' GGCCGGTAAAGGCCGAATAG) que amplificam regiões da subunidade menor do ribossomo (ssu rRNA), com produto de 603 pb. Foram testadas as quantidades de 1, 2, 3, 5, 10 e 50 pmol dos primers e 1,5 – 4,0 mM de MgCl₂. As reações de amplificação foram feitas em um volume final 50 µL, utilizando-se 2 µL de cada amostra de DNA, juntamente com 2,5 µL do tampão da enzima (100 mM TRis-HCl, pH 8,4 e 250 mM KCl), 270 µM de dNTP e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Platinum® - Invitrogen).

b) ITS-1-PCR: os primers LITSR (5' CTGGATCATTTTCCGATG) L5.8S (5' TGATACCACTTATCGCACTT) foram utilizados como primers que amplificam a região do espaçador interno transcrito 1 (ITS-1), região não codificante, encontrada no ssu rRNA, delimitada pelos genes 18S e 5.8S, produzindo bandas de 320 pb. Foram testadas as quantidades de 25.0 e 50.0 pmol dos primers e concentrações de 1.5, 2.5 e 4.0 mM de MgCl₂, em um sistema com 2 µL de cada amostra de DNA, 2,5 µL do tampão, 250 µM de dNTP e 2,5 U de Taq DNA polimerase. O volume final foi de 50 µL.

c) Para a kDNAPCR, nós avaliamos o sistema padronizado pelo Serviço de Referência em Leishmanioses em Pernambuco, com algumas modificações. As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 25 e 50 µL, utilizando-se 2 µL de cada amostra de DNA, juntamente com 2,5 µL do tampão, 250 µM de dNTP, 25pmol de cada primer e 2,5 U de Taq DNA polimerase. Foram testadas concentrações de 0,75 e 1,5 mM de MgCl₂. Foram utilizados os “primers” RV1 (5'CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG) e RV2 (5' CCACCTGGCCTATTTTACACCA) que amplificam a região do minicírculo kDNA, produzindo uma banda de 145 pb (Le FICHOUX et al., 1999).

Os protocolos de ciclagens para cada PCR estão apresentados na tabela 1. Em todas as reações foram feitos controles positivos e negativos, e foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburger-Germany).

Tabela 1. Protocolos de ciclagens das PCR simples

| PCR | Desnaturação (°C, s) | Anelamento (°C, s) | Extensão (°C, s) | Nº de ciclos |
|----------|-------------------------|-----------------------|---------------------|--------------|
| ssu rRNA | 94°, 120 | 53°, 60 | 72°, 120 | 38 |
| ITS-1 | 95°, 45 | 53°, 30 | 72°, 60 | 35 |
| kDNA | 94°, 30 | 67°, 60 | 72°, 30 | 35 |

Para a otimização da nested-PCR, foram seguidos os protocolos da ssu rRNAPCR, para a primeira reação, e ITS-1PCR, para a segunda reação. Todos os ensaios de otimização dos quatro protocolos de PCR foram feitos em triplicata.

Dez microlitros dos produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2.0% com coloração pelo brometo de etídio. As bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta.

2.4. Análise dos dados

Os dados foram processados pelo software OpenEpi, v. 2.0, disponível no endereço eletrônico <http://openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm>. O teste do χ^2 empregado para comparação das sensibilidades, especificidades e taxa de eficiência dos diagnósticos. A equação: verdadeiramente positivos (VP) + verdadeiramente negativos (VN)/VP + VN + falsos positivos + falsos negativos foi usada para determinar a eficiência do diagnóstico.

3. Resultados

3.1. Otimização das PCRs

Nos ensaios com os primers R221/R332, 2 pmol amplificou 10 pg de DNA genômico de *L. infantum*, 3 pmol e 5 pmol amplificaram 1pg e 10 e 50 pmol, 100 fg. Com 1 pmol não houve ampliações. Assim, foi selecionada a quantidade de 10 pmol de primers para avaliação da PCR com as amostras biológicas. Esses resultados foram obtidos com 2,5 mM de Mg^{2+} .

Para a ITS-1-PCR, os melhores resultados foram 100 e 10 fg de DNA para 25.0 e 50.0 pmol dos primers, respectivamente, com 2.5 mM de Mg^{2+} . Desta forma, a concentração de 50 pmol de primers foi aplicada na avaliação com amostras biológicas e na otimização da nested-PCR.

Em relação a kDNAPCR, realizando a PCR em volume final de 50 μ L, as ampliações não foram maiores do que 100 fg de DNA de *L. infantum*. O melhor resultado foi obtido com 25 μ L e 1,5 mM de Mg^{2+} , atingindo-se uma detecção de 1 fg de DNA.

Na otimização da nested-PCR, ao utilizar 50 pmol dos primers R221/R332 na primeira reação, a detecção foi igual ao usar 5 pmol (1 pg) e menor do que quando se usou 10 pmol (10 fg). Escolhemos padronizar a nested-PCR utilizando 10 pmol dos primers R221/R332 e 50 pmol dos primers LITSR/L5.8S (segunda reação) para o uso nas amostras biológicas.

3.2. Avaliação dos alvos moleculares

A Tabela 2 apresenta os valores de sensibilidade e especificidade observados na avaliação dos sistemas de PCR nas amostras de sangue dos pacientes e suas eficiências. Das 15 amostras de sangue de pacientes com leishmaniose, oito foram positivas pela kDNAPCR e

apenas três pela ssu rRNAPCR, ITS-1PCR e nested-PCR (cada). Nenhuma das 33 amostras de sangue de paciente sem a doença apresentou banda na ssu rRNAPCR e nested-PCR, enquanto uma foi positiva na ITS-1PCR e sete na kDNAPCR. Apesar da baixíssima sensibilidade dos alvos ssu rRNA e ITS-1 (20%; IC95%: 7,05 – 45,19%, ambos), esses foram significativamente mais eficientes do que kDNAPCR ($P = 0,002$ e $P = 0,007$, respectivamente).

Tabela 2. Comparação das sensibilidades e especificidades dos sistemas de PCR em sangue de pacientes portadores e não portadores de leishmaniose visceral

| PCR | Sensibilidade (%) (n= 15) (95%IC) | Especificidade (%) (n = 33) (95%IC) | Eficiência (%) (95%IC) |
|----------|--------------------------------------|--|---------------------------|
| ssu rRNA | 20 (7,05 - 45,19) | 100 (89,57- 100) | 75 (61,22-85,08) |
| ITS-1 | 20 (7,05-45,19) | 96,88 (84,26-99,45) | 72,34 (58,24-83,06) |
| Nested | 0,0 (0,0 - 24,25) | 91,67 (78,17-97,13) | 68,75 (54,67-80,05) |
| kDNA | 53,33 (30,12 -75,19) | 54,55 (37,99-70,16) | 54,17 (40,29-67,42) |

As PCR ssu rRNAPCR, ITS-1PCR e nested-PCR não apresentaram ampliações em nenhuma das amostras de soro e urina. Dos quinze soros e catorze urinas dos doentes, a kDNAPCR amplificou DNA em seis e dez amostras, respectivamente. Os parâmetros de avaliação da kDNAPCR nessas amostras biológicas estão mostrados na tabela 2.

Pela kDNAPCR, nove amostras foram falsos negativos com soro, sete com sangue e quatro com urina, não havendo diferença significativa entre as sensibilidades dos testes. As taxas de especificidade variaram de 54,55 a 75,86%. No uso de soro, houve uma menor quantidade de falsos positivos em relação ao sangue e urina (sete, quinze e oito amostras, respectivamente). Porém, só houve diferença significativa de especificidade entre o sangue e o soro, sendo o último o mais específico ($P = 0,008$). Em relação a eficiência da kDNAPCR, usar urina a torna mais eficiente do que o sangue ($P = 0,027$), mas é insignificante a diferença em comparação ao soro.

Tabela 2. Comparação das sensibilidades e especificidades da kDNAPCR em soro e urina de pacientes portadores e não portadores de leishmaniose visceral

| kDNAPCR | Sensibilidade (%) (95%IC) | Especificidade (%) (95%IC) | Eficiência (%) (95%IC) |
|---------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| Soro | 40 (19,82-64,25) (n = 15) | 75,86 (57,89-87,78) (n = 29) | 63,64 (48,87-76,22) |
| Urina | 71,43 (45,35-88,28) (n = 14) | 71,43 (52,94-84,75) (n = 28) | 71,43 (56,43-82,83) |

4. Discussão

As abordagens em PCR tem sido indicadas como ferramentas promissoras para o diagnóstico da leishmaniose visceral (ROCHA et al., 2010). Ótima sensibilidade é obtida quando o alvo a ser amplificado apresenta múltiplas cópias, como o rRNA e o DNA do cinetoplasto (kDNA) (LACHAUD *et al.*, 2002). No kDNA, os minicírculos são no número de 10000 a 20000, com sequências de 500 a 2500 pb (CORTES, 2008).

Apesar do baixo número de cópias do rRNA em comparação ao kDNA, suas subunidades são bem exploradas no desenvolvimento de ferramentas moleculares para diagnóstico da infecção por *Leishmania*, por apresentarem regiões conservadas e não conservadas (SALAM et al., 2009; SCHÖNIAN et al., 2003). O espaçador interno transcrito (ITS) é uma região não codificante encontrada no ssu rRNA, onde o ITS-1 é delimitado pelos genes 18S e 5.8S. Esse espaçador tem sido descrito na identificação de espécies de *Leishmania* e de suas linhagens por meio da PCR-RFLP (SCHÖNIAN et al., 2003).

Em nossos ensaios de otimização, todas as PCR conseguiram amplificar menos que um parasito de *L. infantum*, sendo alcançado um melhor resultado para a kDNAPCR (1fg), como já era esperado devido ao maior número de cópias desse alvo no DNA genômico, como descrito anteriormente. Essa PCR também foi a mais sensível na avaliação com sangue em comparação com os demais alvos estudados, porém menos eficiente, ou seja, a ITS-1PCR e a ssu rRNAPCR classificaria melhor o paciente em doente ou não doente. Nossos dados divergem dos estudos que apontam um desempenho satisfatório dos alvos ssu rRNA e ITS-1 ao serem comparados com a pesquisa direta do parasito e sorologia (EL TAIL et al., 2000; PIZZUTO et al., 2001; DONCKER et al., 2005; BADER et al., 2005; STARK et al., 2006; ANTINORI et al., 2007; FAKHAR et al., 2008; KAZEMI-RAD et al., 2008; ALAM et al., 2009; AMRO et al., 2009; SALAM et al., 2009). No entanto devemos considerar que esses

autores utilizaram como fontes de DNA, amostras de sangue, cultura ou aspirados de medula óssea, onde se há uma maior quantidade de parasitos em relação ao soro e urina. A não amplificação de amostras positivas ao se utilizar soro e urina em nosso estudo pode ter sido devido a escassez de DNA de *L. infantum* nesses fluidos, visto que esses alvos estão em menor número de cópias quando comparados ao kDNA, o que pode ter prejudicado as análises. Apesar da baixa sensibilidade ao se usar sangue, as PCR ssu rRNA e ITS-1PCR foram específicas, principalmente a primeira, com nenhum falso positivo. Esses sistemas podem ser melhorados e validados para triagem de pacientes com suspeitas de leishmaniose visceral a partir do uso do sangue, pois testes muito específicos são frequentemente usados para confirmar a presença da doença, e são necessários quando resultados falso-positivos podem levar o paciente a tratamento ou conduta desnecessários e, às vezes, de risco para o paciente.

A abordagem de nested-PCR com os alvos ssu rRNA e ITS-1, buscando uma maior sensibilidade, devido a menor inibição por inibidores presentes na amostra (esses estão mais diluídos na segunda reação) e maior quantidade de alvos, resultantes dos amplicons da primeira reação, não foi o diferencial para os alvos ssu rRNA e ITS-1. Espera-se que com o aprimoramento dessas duas PCR simples, melhores resultados sejam alcançados com a nested-PCR.

A utilização de urina como amostra para PCR no diagnóstico da leishmaniose visceral tem se mostrado promissora, pois além da coleta não-invasiva, podendo ser realizada em qualquer momento do dia, as técnicas têm mostrado sensibilidade em torno de 88 – 97%, e uma especificidade de 100% (SOLANO-GALLEGO et al., 2007; FISA et al., 2008, MOTAZEDIAN et al., 2008). Veland et al. (2011) descreve a presença de kDNA em urinas de pacientes com leishmaniose cutânea, com uma sensibilidade e especificidade de 20,9%. Motazedian et al. (2008) descreve pela primeira vez a pesquisa de DNA para o diagnóstico da leishmaniose visceral, utilizando o kDNA e os primers descritos em nosso estudo. Os autores obtiveram uma sensibilidade de 96,8% e especificidade de 100%. Porém, os autores classificaram pacientes como doentes também pelos resultados positivos na pesquisa de anticorpos, quando não necessariamente o indivíduo tem o parasito, mas um indicativo que em algum momento da vida ele entrou em contato com o parasito. Ao avaliarmos apenas com pacientes que possuíam aspirado de medula óssea positivo para pesquisa de *L. infantum*, o que nos garante que o indivíduo tinha o parasito, houve um considerado percentual de falsos negativos, como também de falsos positivos. Entretanto, a kDNAPCR é uma ferramenta promissora para o diagnóstico da leishmaniose visceral em urina, podendo ser aplicada

quando na dificuldade de coleta do sangue e na ausência do soro. Mais estudos deverão ser feitos para a validação dessa PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral.

Referências

- ALAM, M.J., et al. Comparative studies on IFAT, ELISA & DAT for serodiagnosis of visceral leishmaniasis on Bangladesh. Bangladesh Medical Research Council, v. 22, n.1, p.27-32, 1996.
- ANTINORI, S., CALATTINI, S., LONGHI, E., BESTETTI, G., PIOLINI, R., MAGNI, C., ORLANDO, G., GRAMICCIA, M., ACQUAVIVA, V., FOSCHI, A., CORVASCE, S., COLOMBA, C., TITONE, L., PARRAVICINI, C., CASCIO, A., CORBELLINO, M. Clinical Use of Polymerase Chain Reaction Performed on Peripheral Blood and Bone Marrow Samples for the Diagnosis and Monitoring of Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected and HIV-Uninfected Patients: A Single-Center, 8-Year Experience in Italy and Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases*, v.44, p.1602–10, 2007.
- BADER, K.A., SCHNUR, L.F., NASEREDDIN, A., PRATLONG, F., DEDET, J., SHAHEEN, L., YOUSEF, O., GREENBLATT, C.L. Short Communication: Palestinian infantile visceral leishmaniasis caused by a genetic variant of *Leishmania infantum* belonging to a new zymodeme. *Tropical Medicine and International Health*, v. 10, n. 6, p. 618–620, 2005.
- CORTES, S.J.C. Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal. Tese de Doutorado. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2008, 163p.
- DONCKER, S., HUTSE, V., ABDELLATI, S., RIJAL, S., KARKI, B.S., DECUYPERE, S., JACQUET, D., LE RAY, D., BOELAERT, M., KOIRALA, S., DUJARDIN, J. A new PCR—ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 99, p. 25—31, 2005.
- EL TAIL, N., OSMAN, F., EL FAR, M., PRESBEFI, W., SCHÖNIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.94, p. 575-579, 2000.
- FAKHAR, M., MOTAZEDIAN, M.H., HATAM, G.R., ASGARI, Q., KALANTARI, M., MOHEBALI, M. Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 102, n. 7, p. 1–7, 2008.
- FISA, R., RIERA, C., LÓPEZ-CHEJADE, P., MOLINA, I., GÁLLEGO, M., FALCÓN, V., RIBERA, E., PORTÚS, M. *Leishmania infantum* DNA detection in urine from patients with visceral leishmaniasis and after treatment control. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 78, n. 5, p. 741–4, 2008.
- KAZEMI-RAD, E., MOHEBALI, M., HAJJARAN, H., REZAEI, S., MAMISHI, S. Diagnosis and Characterization of *Leishmania* Species in Giemsa-Stained slides by PCR-RFLP. *Iranian Journal of Public Health*, v. 37, n.1, p.54-60, 2008.
- LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P. BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 210- 215, 2002.
- MOTAZEDIAN, M., FAKHAR, M., MOTAZEDIAN, M.H., HATAM, G., MIKAEILI, F. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in

- immunocompetent patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 60, p. 151–154, 2008.
- OPAS. [Online] Available from: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/leish-2007.htm>. [Accessed on Jul, 23, 2012].
- PIZZUTO, M., PIAZZA, M., SENESE, D., SCALAMOGNA, C., CALATTINI, S., CORSICO, L., PERSICO, T., ADRIANI, B., MAGNI, C., GUARALDI, G., GAIERA, G., LUDOVISI, A., GRAMICCIA, M., GALLI, M., MORONI, M., CORBELLINO, M., ANTINORI, S. Role of PCR in Diagnosis and Prognosis of Visceral Leishmaniasis in Patients Coinfected with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, p. 357–361, 2001.
- ROCHA, M.N., MARGONARI, C., PRESOT, I.M., SOARES, R.P. Evaluation of 4 polymerase chain reaction protocols for cultured *Leishmania* spp. Typing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.68, p. 401–409, 2010.
- SALAM, M.A., MONDAL, D., KABIR, M., HAQUE, R. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of kala-azar in an endemic zone of Bangladesh. *Pakistan Journal Medical Sciences*, v. 25, n. 4, p. 635 – 640, 2009.
- SCHALLING, H. D. F. H., OSKAN, L., DUBESSAY, P. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis using peripheral blood. *Tropical Medicine & Interantional Health*, v. 7, p. 641-51, 2002.
- SCHÖNIAN, G., NASEREDDIN, A., DINSE, N., SCHWEYNOCH, C., SCHALLIG, H.D.F.H, PRESBER, W., JAFFE, C.L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbioloy of Infectious Disease*, v. 47, p. 349–358, 2003.
- SOLANO-GALLEGO L, RODRIGUEZ-CORTES A, TROTTA M, ZAMPIERON C, RAZIA L, FURLANELLO T, et al.. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v. 147, n.3-4., p.15–9, 2007.
- STARK, D., PETT, S., MARRIOTT, D., HARKNESS, J. Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patient. *Journal Clinical Microbiology*, v. 40, p.1178–1180, 2006.
- VELAND, N., ESPINOSA, D., VALENCIA, B.M., RAMOS, A.P., CALDERON, F., AREVALO, J., LOW, D.E., LLANOS-CUENTAS, A., BOGGILD, A.K. Polymerase chain reaction detection of *Leishmania* kDNA from the urine of Peruvian patients with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Apr;84(4):556-61.
- WEISS, J. B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*; v. 8, p. 113-30, 1995.

7 CONCLUSÃO

A nested-PCR desenvolvida com os alvos ssu rRNA e ITS-1 não teve bom desempenho quando utilizada em amostras biológicas. A PCR foi específica mas não foi sensível nessas amostras, apesar dos bons resultados na utilização de DNA genômico de *L. infantum*. Assim, esses sistemas não podem ser aplicados no diagnóstico da leishmaniose visceral na forma proposta. Mais ensaios para melhoria desses sistemas devem ser realizados para uma futura aplicação dessa PCR e da STNPCR objetivando a triagem de pacientes com suspeitas de leishmaniose visceral, pois testes muito específicos são frequentemente usados para confirmar a presença da doença, e são necessários quando resultados falso-positivos podem levar o paciente a tratamento ou conduta desnecessários e, às vezes, de risco para o paciente. Contudo, a kDNAPCR tem sensibilidade e especificidade razoável quando aplicada em urina e pode ser melhorada para validação de uma forma de diagnóstico sensível com coleta de amostra de forma não invasiva.

REFERÊNCIAS

ABATH, F. G.; MELO, F.L., WHERKHAUSER, R.P. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. **Biotechniques**, Londres, v. 33, n. 6, p. 1210-1214, 2002.

ABDALLAH, K.A. et al. Evaluation of the direct agglutination test based on freeze-dried *Leishmania donovani* promastigotes for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Sudanese patients. **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v.9, n.10, p. 1127-1131, 2004.

ABDA, I. B. et al. Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 105, p. 17–22, 2011.

ALAM, M.J. et al. Comparative studies on IFAT, ELISA & DAT for serodiagnosis of visceral leishmaniasis on Bangladesh. **Bangladesh Medical Research Council**, Dacca, v. 22, n.1, p.27-32, 1996.

ALAM, M.Z. et al. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v.14, n.5, p. 499–503, 2009.

ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA, P. et al. HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in central-west Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.105, p.692-697, 2010.

ALVAR, J. et al. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v.21, p.334-359, 2008.

ANDRADE, C.R. et al. *Leishmania donovani donovani* and *Leishmania donovani chagasi* as antigens in a direct agglutination assays for diagnosis of kala-azar. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.22, n.5, p. 611-615, 1989.

ANDRESEN, K. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by the polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymph node samples from patients from the Sudan. **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v.2, n.5, p.440-444, 1997.

ANTINORI, S. et al. Leishmaniasis among organ transplant recipients. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v.8. p.191–199, 2008.

ATTAR Z. J. et al. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.78, n.1, p.11-16, 2001.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 7. ed. rev. Brasília : Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011a.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011b.

BOELAERT, M. et al. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 102, p. 32-40, 2008.

BOELAERT, M. et al. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. **Nature Review Microbiology**, Londres, p. S30-S39. 2007.

BORA, D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Índia. **The National Medical Journal of Índia**, New Delhi, v.12, p.62-68, 1999.

CARRANZA-TAMAYO, C.O. et al. Prevalence of *Leishmania* infection in adult HIV/AIDS patients treated in a tertiary-level care center in Brasilia, Federal District, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v.103, p.743-748, 2009.

CATORZE, M. G. B. Leishmaniose e SIDA. **Medicina Cutanea Ibero Latino-Americana**, Madri, v.33, n.6, p.237-250, 2005.

CAVALCANTI, A. T.A. et al. Diagnosing visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection: a case study in Pernambuco, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.54, p.43-47, 2012.

CHAPPIUS, F. et al., M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **British Medical Journal**, Londres, v. 33, p. 723–726, 2006.

CHAPPUIS, F. et al.. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature reviews Microbiology**, Londres, v.5, p. S7 – S16, 2007.

COLOMBA, C. et al. Cryptic *Leishmania infantum* infection in Italian HIV infected patients. **BMC Infectious Diseases**, Londres, v.9, n. 199, p. 1 – 7, 2009.

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

CRUZ, I. et al. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v.123, p.357-388, 2006.

DANTAS-TORRES F., BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.48, p.151-156, 2006.

DOURADO, Z.F.S. **Diagnóstico da Leishmaniose visceral em áreas rurais, endêmicas e não endêmicas, utilizando um teste imunocromatográfico recombinante K39 (2004-2006)**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

DOURADO, Z. F. S. et al. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rk39). **Revista de Patologia Tropical**, Goiania, v. 36, n. 3, p. 205-214, 2007.

DUPIN, N. et al. HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV-infected patients with lipodystrophy. **AIDS**, Londres, v. 16, n. 18, p. 2419-2424, 2002.

EL HARITH, A. et al. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, n.7, p. 1321-1325, 1998.

EISENSTEIN, B. I. The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 322, n. 3, p. 178-183, 1990.

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**, Northbrook, v. 78, n. 5, p. 741-744, 2008.

FLOETER-WINTER, L.M. Descrição e utilização de alvos moleculares para identificação de *Leishmania* por PCR. **Bepa**, São Paulo, v.7, p.73, 2010.

FREITAS-JUNIOR, L.H. et al. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [S.l.], v. 2, p. 11–19, 2012.

GARCÍA-GARCÍA, J.A. et al. Use of noninvasive markers to detect *Leishmania* infection in asymptomatic human immunodeficiency virus infected patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.44, p.4455-4458, 2006.

GAVGANI, A.M., KHADEMVATAN, S., GHAZANCHAEI, A. KAtex antigen-detection test as a diagnostic tool for latent visceral leishmaniasis cases. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v.7, n.7, p.852-859, 2008.

GOMES, A.L.V. et al. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers for the identification of dengue virus serotypes. **Journal of virological methods**, Amsterdam, v. 145, p.76–79, 2007.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

HAILU, A. et al. Visceral Leishmaniasis: New Health Tools Are Needed. **PLoS Medicine**, San Francisco, v. 2, n. 7, p. 590-594, 2005.

JAMJOOM, M.B. et al.. *Leishmania donovani* is the only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous descriptions of *L. infantum* and “*L. archibaldi*” from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data. **Parasitology**, Amsterdam, v.129, p. 399–409, 2004.

KALLEL, K. et al. Asymptomatic bearing of *Leishmania infantum* among Tunisian HIV infected patients. **Pathologie Biologie** (Paris), Paris, v. 55, p. 521-524, 2007.

KAR, K. Serodiagnosis Leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, Londres, v.21, n.2, p. 123-152, 1995.

LACHAUD, L. et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 1, p. 210- 215, 2002.

LLOP, P. et al.. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 5, p. 2071-2078, 2000.

LOCKSLEY, R.M. et al.. Susceptibility to infectious diseases: *Leishmania* as a paradigm. **Journal Infectious Disease**, Oxford,v. 179, Suppl. 2, S305-S308, 1999.

LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Allahabad, v.104, p. 9375–9380, 2007.

MAIA-ELKHOURY, A.N.S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, n.12, p.2941-2947, 2008.

MALTEZOU, H.C. et al. Visceral leishmaniasis during childhood in Southern Greece. **Clinical Infectious Disease**, Oxford, v.31, p.1139-1143, 2000.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES M. A. *Leishmania donovani* complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. **Parasitology**, Amsterdam, v. 128, p. 263–267, 2004.

MAURICIO, I.L. et al. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). **International Journal of Parasitology**, [S.l.], v.36, p.757-769, 2006.

MELO, F. L. **Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em pcr para a detecção de *Schistosoma Mansoni***. Tese (Doutorado) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

MITTAL, V.; BATHIA, R.; SEHGAL, S. Serodiagnosis of Indian kala-azar: evaluation of IFA, ELISA and CIEP tests. **Journal Communicable diseases**, Delhi, v. 23, n.2, p.131-134, 1991.

Montenegro, L. M. et al. Development of a single tube hemi-nested PCR for genus specific detection of *Plasmodium* in oligoparasitemic patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 98, n.10, p. 619-625, 2004.

MOTAZEDIAN, M. F. et al. Urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Nova Iorque, v. 60, n. 2, p. 151-154, 2008.

NUNO-MARQUES, S. et al. Leishmaniose Visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana. **Acta Medica Portuguesa**, Lisboa, v.20, p. 291-298, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Control of the leishmaniasis**: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva, 2010a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Indicators for monitoring and evaluation of the kala-azar elimination programme**. Geneva, 2010b. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/kala_azar_indicators/en/index.html>. Acesso em: 20 maio 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Distribution of visceral leishmaniasis, world wide, 2009**. 2010c. Disponível em: <http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_leishmaniasis_visceral_2009.png>. Acesso em 20 agosto 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases**: A roadmap for implementation. Geneva, 2012. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2012/WHO_HTM_NTD_2012.1_eng.pdf>. Acesso em: 20 maio 2012.

PINTADO, V. et al. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV) — infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. **Medicine (Baltimore)**, Baltimore, v. 80, p.54-73, 2001.

POLANCO, C. et al. Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting patterns of homogenization for IGS and ITS spacer regions. A possible mechanism to resolve this paradox. **Genetics**, Bethesda, v.149, p.243-256, 1998.

A MULTIPLICAÇÃO dos fragmentos do DNA In: PORTAL DE BIOLOGIA E CIÊNCIA. Disponível em: <<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Biotecnologia/PCR.php>>. Acesso em: 3 agosto 2012.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROMERO, G.A.S.; BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v.4, Issue 1, p.1-17, 2010.

ROSENTHAL, E. et al. Visceral leishmaniasis and HIV-1 coinfection in southern France. **Transaction Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, Londres, v.89, n.2, p. 159-162, 1995.

ROSENTHAL, E. et al. Leishmania coinfection: a review of 91 cases with focus on atypical locations of Leishmania. **Clinical Infectious Disease**, Oxford, v.31, n.4 p. 1093-1095, 2000.

SCHALLING, H. D. F. H.; OSKAN, L.; DUBESSAY, P. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis using peripheral blood. **Tropical Medicine & Interantional Health**, Oxford, v. 7, p. 641-651, 2002.

SCHEINERT, P.; BEHRENS, B.; KAHLE, D. Optimizing DNA Amplification Protocols using the Eppendorf® Mastercycler®. **Biochemia Medica**, Zagreb, v. 8, p.2-3, 1995.

SCHÖNIAN, G.; KUHL, K.; MAURICIO, I.L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of Leishmania. **Parasitology**, Amsterdam, v.138, p. 405–425, 2011.

SILVA, M. B. B.; STEWART, J. M.; COSTA, C. H. N. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Northbrook, v.72, n.6, p.811-814, 2005.

SOLANO-GALLEGU, 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.

Souza, G. et al. Development and evaluation of a single tube nested PCR based approach (STNPCR) for the diagnosis of plague. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Nova Iorque, v. 603, p. 351-359, 2007.

SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. **PloS one**, São Francisco, v.105, p. 4-6, 2011.

SUNDAR, S; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, p. 951-958, 2002.

TAO, S. C. et al. One-tube nested RT-PCR enabled by using a plastic film and its application for the rapid detection of SARS-virus. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 179-183, Feb. 2004.

TAYLOR, C. et al. Determination of the order of substrate addition to MspI DNA methyltransferase using a novel mechanism-based inhibitor. **The Biochemical Journal**, London, v. 291, pt. 2, p. 493–504, 1993.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to Leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Oxford, v. 51, p. 229–242, 2007.

WERNECK, G.L. et al. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Infection**, München, v.31, p.174–177, 2003.

WEISS, J. B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. **Clinical Microbiology Reviews**; v. 8, p. 113-30, 1995.

LEISHMANIOSE In: WIKIPEDIA, a enciclopédia livre. Disponível em:<
<http://pt.wikipedia.org/wiki/Leishmaniose>>. Acesso em: 01 agosto 2012.

WORLD HEALTH ASSEMBLY, 63., 2010, Geneva. **Provisional agenda item 11.13**. Geneva: Organização Mundial de Saúde. Disponível em:< new.paho.org/hq/index.php>. Acesso em: 20 maio 2012.

ZIJLSTRA, E.E. et al. Direct agglutination test for diagnosis and sero-epidemiological survey of kala-azar in the Sudan. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 85, n.4, p. 474-476, 1991.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para menor de idade

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, responsável pelo menor _____, acompanhado no Hospital _____, permito que este participe do projeto de pesquisa **DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS BASEADOS EM NESTED-PCR, PARA A IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE PARASITÁRIA E PARA O DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL EM SANGUE E URINA, UTILIZANDO COMO ALVO O ESPAÇADOR INTERNO TRANSCRITO-1 (ITS-1) DO RRNA**, cujo objetivo é o desenvolvimento de um diagnóstico mais simples e rápido para a leishmaniose visceral ou calazar.

Permito que seja realizado 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, farei uma coleta do líquido presente dentro do osso, obtido por punção na medula óssea (medulograma), 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.

Estou ciente que 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.

Fui informado que esses exames serão importantes para o tratamento, pois o diagnóstico de Calazar, quando feito cedo e com certeza, contribuirá para que o tratamento seja realizado de forma mais segura, com redução do tempo de internação e com recuperação mais rápida.

Estou ciente que os resultados dos exames (teste de aglutinação direta, imunofluorescência indireta, medulograma e a reação de cadeia de polimerase) aos quais a urina e/ou sangue serão submetidos, serão entregues ao médico assistente que deixará o resultado no prontuário. Na dependência do(s) resultado(s) positivo(s), o menor será acompanhado pelo médico e/ou tratado para Calazar na Unidade hospitalar de origem.

Está garantido que o abandono a qualquer momento da pesquisa, não prejudicará o acompanhamento clínico e terapêutico do paciente. Autorizo a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) a conservar, sob sua guarda, qualquer amostra de sangue, líquido de medula ou urina para exame de laboratório, e caso esse material seja utilizado em futuras pesquisas, o responsável pelo menor será contatado para autorização desse uso. Como também autorizo que as informações médicas obtidas do paciente sejam usadas em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade.

Declaro ter compreendido e concordado com todos os termos deste consentimento informado. Antes da participação no referido projeto, um dos pesquisadores do projeto dará as informações que eu julgar necessárias para meu melhor entendimento e solicitará meu consentimento livre e esclarecido para os procedimentos citados nesse termo. Finalmente, assinarei esse termo de consentimento em duas vias, sendo que uma ficará sob a minha guarda e a outra será arquivada pelo CPqAM/FIOCRUZ.

Recife, ____ de _____ de 20____

Assinatura do paciente

Assinatura do responsável

Endereço - Rua (paciente ou responsável)

Testemunha: _____

Assinatura do Membro da Equipe de Pesquisa

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

Dra. Zulma Medeiros, biomédica do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n , no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 2101-2662.

Dr. Fábio Melo, biólogo do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n , no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 2101-2662.

Maria Almerice Lopes da Silva, Farmacêutica, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n , no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 2101-2695.

Esse projeto antes de seu início foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, podendo ser confirmado no site www.saude.gov.br/sisnep

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para adulto**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu _____
_____, acompanhado no Hospital _____, aceito em participar do projeto de pesquisa **DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS BASEADOS EM NESTED-PCR, PARA A IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE PARASITÁRIA E PARA O DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL EM SANGUE E URINA, UTILIZANDO COMO ALVO O ESPAÇADOR INTERNO TRANSCRITO-1 (ITS-1) DO RRNA**, cujo objetivo é o desenvolvimento de um diagnóstico mais simples e rápido para a leishmaniose visceral ou calazar.

Permito que seja realizado 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, farei uma coleta do líquido presente dentro do osso, obtido por punção na medula óssea (medulograma), 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.

Estou ciente que 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.

Fui informado que esses exames serão importantes para meu tratamento, pois o diagnóstico de Calazar, quando feito cedo e com certeza, contribuirá para que meu tratamento seja realizado de forma mais segura, com redução do tempo de internação e com recuperação mais rápida.

Estou ciente que os resultados dos exames (teste de aglutinação direta, imunofluorescência indireta, medulograma e a reação de cadeia de polimerase) aos quais minha urina e/ou sangue serão submetidos, serão entregues a minha pessoa e ao meu

médico assistente que deixará o resultado no meu prontuário. Na dependência do(s) resultado(s) positivo(s) serei acompanhado pelo médico e/ou tratado para Calazar na Unidade hospitalar de origem.

Sou livre para interromper a qualquer momento minha participação na pesquisa, sem nenhuma forma de prejuízo ao meu acompanhamento clínico e terapêutico. Autorizo a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) a conservar, sob sua guarda, qualquer amostra de sangue, líquido de medula ou urina para exame de laboratório, e caso esse material seja utilizado em futuras pesquisas serei contatado para autorização desse uso. Como também autorizo que as informações médicas obtidas de minha pessoa sejam usadas em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a minha identidade.

Declaro ter compreendido e concordado com todos os termos deste consentimento informado. Antes da minha participação no referido projeto, um dos pesquisadores do projeto dará as informações que eu julgar necessárias para meu melhor entendimento e solicitará meu consentimento livre e esclarecido para os procedimentos citados nesse termo. Finalmente, assinarei esse termo de consentimento em duas vias, sendo que uma ficará sob a minha guarda e a outra será arquivada pelo CPqAM/FIOCRUZ.

Recife, ____ de _____ de 20____

Assinatura do usuário

Endereço - Rua (usuário)

Testemunha:

Assinatura do Membro da Equipe de Pesquisa

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

Dra. Zulma Medeiros, biomédica do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n , no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 2101-2662.

Dr. Fábio Melo, biólogo do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n , no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 2101-2662.

Maria Almerice Lopes da Silva, Farmacêutica, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n , no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 2101-2695.

Esse projeto antes de seu início foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, podendo ser confirmado no site www.saude.gov.br/sisnep

ANEXOS

ANEXO A – Parecer de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães



Título do Projeto: Desenvolvimento de sistemas baseados em Nested-PCR, para a identificação da espécie parasitária e para o diagnóstico de leishmaniose visceral em sangue e urina, utilizando como alvo o espaçador interno transcrito-1(ITS-1) do DNAr.

Pesquisador responsável: Maria Almerice Lopes da Silva

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 21/05/09

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 16/09

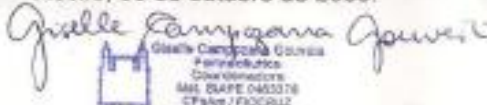
Registro no CAAE: 0015.0.000.095-09

PARECER Nº 48/2009

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

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 08 de outubro de 2012. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 08 de outubro de 2009.

Iselle Campagna Aguiar

 Iselle Campagna Aguiar
 Coordenadora
 MSc. SIAPE 0463376
 CPqAM / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 08/10/2010.

ANEXO B – Parecer de aprovação do Artigo 1 pela Revista Eletrônica de Farmácia

696) CONTATOS BUSCAR: revista eletr... REF Vol. 7, No 3 (2010)

Apagar Responder Encaminhar Spam Imprimir

REF Vol. 7, No 3 (2010) Ocultar detalhes

DE: REFF FF - UFG + Terça-feira, 4 de Janeiro de 2011 16:29

PARA: almerice_lopes@yahoo.com.br carolina@cpqrr.fiocruz.br + thy_rocha@hotmail.com + 4 mais... *

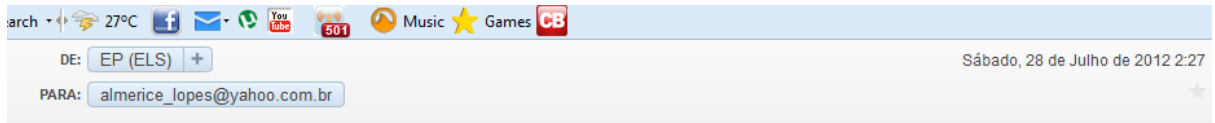
1

Prezados Autores,
vimos através desta comunicar que seus artigos se encontram disponíveis on line <http://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/issue/view/959/showToc>. Os mesmos passaram por revisão dos idiomas sem que tenham ocorrido alterações dos conteúdos. Mais uma vez, a Revista Eletrônica de Farmácia agradece suas contribuições e a escolha da mesma para publicarem os seus trabalhos. Desde já, gratos.

Cordialmente,

1 Prof Dr Ricardo Menegatti
Editor Chefe da Revista Eletrônica de Farmácia

ANEXO C – Cópia do e-mail da submissão do artigo 2



Ms. No.: EP-12-241
Title: Optimization of single-tube nested PCR for diagnosing visceral leishmaniasis.
Corresponding Author: Mrs Maria Americo Lopes da Silva
Authors: Cynthia Regina P Soares; Rafael A Medeiros; Zulma Medeiros, PhD; Fábio L Melo, PhD

Dear Mrs Silva,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: EP-12-241

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/ep/>

Your username is: almerice

If you cannot remember your password, please click the "Send Username/Password" link on the login page.

Thank you for submitting your work to Experimental Parasitology.

Kind regards,

D. Jones
Experimental Parasitology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>
Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ANEXO D – Cópia do e-mail da submissão do artigo 3

DE: Brazilian Journal of Infectious Diseases +

PARA: almerice_lopes@yahoo.com.br

Sexta-feira, 3 de Agosto de 2012 16:01

Ms. Ref. No.: BJID-D-12-00376
Title: A comparison of four DNA extraction protocols for analysis of urine from patients with visceral leishmaniasis
Brazilian Journal of Infectious Diseases

Dear Almerice,

Your submission "A comparison of four DNA extraction protocols for analysis of urine from patients with visceral leishmaniasis" will be handled by Editor-in-Chief Carlos Brites.

You may check the progress of your paper by logging into the Elsevier Editorial System as an author at <http://ees.elsevier.com/bjid/>.

Enter these login details:
Your username is: almerice

If you can't remember your password please click the "Send Password" link on the Login page.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Elsevier Editorial System
Brazilian Journal of Infectious Diseases

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>
Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.