



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Eliamara Barroso Sabino

**UTILIZAÇÃO DE RNAm DO GENE HSP70 PARA QUANTIFICAÇÃO  
DE PARASITEMIA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE  
VISCERAL HUMANA**

Teresina- PI  
2018

Eliamara Barroso Sabino

**UTILIZAÇÃO DE RNAm DO GENE HSP70 PARA QUANTIFICAÇÃO  
DE PARASITEMIA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE  
VISCERAL HUMANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto Focal, Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa

**Co-orientador:** Dr. Vladimir Costa Silva



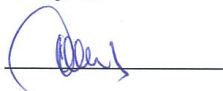
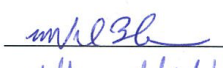
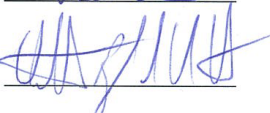
Teresina- PI  
2018

**FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE**

**ALUNA:** ELIAMARA BARROSO SABINO

**TÍTULO DO PROJETO:** “Utilização de RNAm para quantificação de parasitemia em pacientes com Leishmaniose Visceral Humana”

**PROFESSOR ORIENTADOR:** Carlos Henrique Nery Costa

<b>BANCA EXAMINADORA:</b>	<b>CONCEITO</b>	<b>ASSINATURA</b>
Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa - UFPI (Presidente)	<u>SABINO</u>	
Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	
Prof. Dr. Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar - UNINOVAFAPI (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	
Prof. Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto - Fiocruz (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	

**DATA DA AVALIAÇÃO:** 24 de abril de 2018.

**HORÁRIO:** 14:00h

**LOCAL:** Auditório do Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses o Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella.

*A Deus, por mais esta conquista. Agradeço-te por me mostrar que sou protegida, guiada e iluminada pela sua presença no mais íntimo do meu ser.*

*Aos meus pais, Raimundo e Antônia (em memória), minhas referências de boa conduta. Vocês sempre me apoiaram em todos os momentos da vida e foram os principais responsáveis pela minha educação.*

## AGRADECIMENTOS

**A Deus**, neste momento tão importante em minha vida, pois sei que, se cheguei até aqui, foi porque Tuas mãos me sustentaram, por cada vitória dessa caminhada e por hoje me proporcionar a concretização deste sonho.

À **Nossa Senhora Aparecida**, que me deu sempre a segurança e a tranquilidade nesta caminhada.

Ao Prof. Dr. **Carlos Henrique Nery Costa**, meu orientador, agradeço por seu grande incentivo à pesquisa e pelo apoio na realização desta pesquisa, sempre apresentando ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento científico.

Ao Prof. Dr. **Vladimir Costa Silva**, agradeço por seu grande auxílio científico e pela disponibilidade na produção desta pesquisa.

**Aos membros da banca examinadora**, pela disposição e pela paciência em analisar este trabalho.

**Aos colegas do LabLeish**, por experimentarem comigo esses anos de pós-graduação, por terem vivido comigo, me ajudado nos experimentos e me auxiliado em todas as horas, na correria e no desespero do final do nosso doutorado.

**A todos os pacientes** vítimas de Leishmaniose Visceral que aceitaram participar desta pesquisa, contribuindo assim para o avanço científico e intelectual do Brasil.

Aos meus amados pais, **Raimundo Sabino Neto e Antônia Barroso de Carvalho Sabino** (em memória), por serem incansáveis em minha educação e felicidade. A vocês todo o meu amor e a minha gratidão. Às minhas irmãs, **Carla Kelly e Soraia Barroso Sabino**, pela cumplicidade e pelo amor incondicional.

À **Maria Valentina**, sei que és um anjo de luz e que sempre estás olhando por mim e guiando meus caminhos.

Ao meu noivo, **Emmanuel Nogueira Lima**, por toda compreensão, pelo incentivo, pelo apoio incondicional nesta caminhada. Obrigada por nunca me deixar desistir.

Agradeço a **UNINOVAFAPI** pelo incentivo a pesquisa, com a bolsa de capacitação docente. Obrigada por acreditar e incentivar o aprimoramento do seu corpo docente.

A todos aqueles que me ajudaram, direta ou indiretamente, a concluir este trabalho, muito obrigada.

“Nunca desista. Grandes coisas levam tempo.”  
Autor Desconhecido

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”  
George Bernard Shaw

## RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil é considerada um grave e emergente problema de saúde pública em áreas urbanas de grandes capitais. A LV é causada pelas espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, sua importância deve-se ao fato de assumir formas graves e letais quando o diagnóstico e o tratamento não são eficazes. O diagnóstico representa uma dificuldade para o controle da doença, devido a variações metodológicas. Nesse contexto, os métodos moleculares melhoram a sensibilidade e podem diagnosticar pacientes assintomáticos e imunossuprimidos. A presença de transcritos de RNA vem demonstrando ser um bom biomarcador e campo promissor para a pesquisa de parasitas viáveis em amostras biológicas. Acredita-se que devido à labilidade e à rápida degradação, a quantidade de RNA de parasitas circulantes em sangue periférico do hospedeiro pode ser uma estimativa da parasitemia e um preditor de infecciosidade. A PCR quantitativa de RNA (RT-qPCR) pode determinar o número de parasitas viáveis. O objetivo desta pesquisa foi descrever a presença de RNA de *L. infantum* em sistema de PCR quantitativa (qPCR) e utilizar o RNAm de leishmania para fins diagnóstico. A reação em cadeia da polimerase quantitativa foi realizada em amostras de sangue de 79 pacientes com calazar admitidos em um hospital de referência em Teresina - PI, Brasil. Foram extraídos DNA e RNA de sangue dos pacientes para posterior quantificação. Os primers foram usados para amplificar kDNA para RNA e DNA, usando o sistema TaqMan; e, para RNA, utilizou como marcador o gene HSP70, usando o sistema SYBR Green. Houve maior quantificação de parasitas para DNA em comparação ao RNA e apresentou correlação positiva ( $p= 0,03$ ;  $Rho 0,23$ ). A mediana da estimativa de parasitemia para o RNA foi de 32,5 parasitas/mL e para o DNA a foi de 1380 parasitas/mL. A parasitemia estimada não se mostrou associada à idade, ao gênero, à infecção pelo HIV, à gravidade do quadro clínico ou à morte. O ensaio sorológico de 61/78 pacientes com LVH foram reagentes, apresentando uma sensibilidade de 78% (95% IC: 67; 87) e especificidade de 86% (95% IC: 59; 98). Para os métodos moleculares, para quantificação do DNA por qPCR apresentou 74/79 pacientes positivos com sensibilidade de 94% (95% IC: 86; 98) e especificidade de 100%. Para qRT-PCR utilizando o sistema SYBR Green, 41/79 pacientes foram positivos com sensibilidade de 64% (95% IC: 52; 75) e especificidade de 82% (95% IC: 66; 92). Para qRT-PCR utilizando o sistema Taqman, todos os pacientes foram positivos com sensibilidade de 100% e especificidade de 95% (95% IC: 83; 99). A RT-qPCR demonstrou ser uma técnica promissora e pode ser validada para estimativa da parasitemia e para eventual substituição do xenodiagnóstico para verificação da infecciosidade de reservatórios com calazar.

**Palavras-chave:** Diagnóstico. Leishmaniose Visceral. RNA. qPCR.

## ABSTRACT

The Visceral Leishmaniasis (VL), in Brazil, is considered a severe emergent public health problem in the urban areas of the great cities. The VL is caused by the species *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*, and its importance is due to the fact it takes serious and lethal forms when diagnosis and treatment are not efficient. The diagnostic represents a trouble in the sense of disease control, due to methodological variations. In this context, molecular methods improve the sensibility and can diagnose asymptomatics and immunosuppressed patients. The presence of RNA transcripts have been shown to be a good biomarker and a promising research field on viable parasites in biological samples. It is believed that due to the lability and the fast degradation, the amount of RNA of circulating parasites in peripheral blood of the host may be a parasitaemia estimate and an infectivity predictor. The quantitative RNA PCR (RT-qPCR) can determine the number of viable parasites. The objective of this research is to describe the presence of *L. infantum*'s RNA in a system of quantitative PCR (qPCR) and to use leishmania mRNA for diagnostic purposes. The quantitative polymerase chain reaction was performed in blood samples of 79 kala-azar's patients admitted on a reference hospital at Teresina, Piauí, Brazil. It was extracted DNA and RNA of the patients for a posterior quantification. The primers were used to amplify kDNA into RNA and DNA, using the TaqMan system; and, for RNA, has utilized, as marker, the HSP70 gene, using the SYBR Green system. There was higher quantification of DNA parasites in comparison to RNA and showed positive correlation ( $p = 0.03$ ;  $Rho = 0.23$ ). The median estimate of parasitemia for RNA was 32.5 parasites / mL and for DNA was 1380 parasites / mL. Estimated parasitemia was not associated with age, gender, HIV infection, severity of disease or death. By serological test, 61/78 patients with VL were positive, presenting a sensitivity of 78% (95% CI: 67; 87) and specificity of 86% (95% CI: 59; 98). For qRT-PCR using the SYBR Green system, 41/79 patients were positive with a sensitivity of 64% (95% CI: 52; 75) and specificity of 82% (95% CI: 66; 92). For qRT-PCR using the Taqman system, all patients were positive with 100% sensitivity and 95% specificity (95% CI: 83; 99). The RT-qPCR proved to be a promising technique and can be validated for the estimation of parasitemia and for eventual replacement of xenodiagnosis to verify the infectivity of reservoirs with kala-azar.

**Keywords:** Diagnosis. Visceral leishmaniasis. RNA. qPCR.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	DNA complementar
DIC	Coagulação intravascular disseminada
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFAT	Teste indireto de anticorpos
IFI	Imunofluorescência indireta
HI	Hemaglutinação indireta
LV	Leishmaniose Visceral
LVH	Leishmaniose Visceral humana
LTA	Leishmaniose tegumentar
KATex	Teste de aglutinação do látex
PCR	Reação em cadeia da enzima polimerase
Primers	Oligonucleotídeos iniciadores
PKDL	Post kala-azar dermal leishmaniasis (Manifestações dérmicas pós calazar)
qPCR	Reação de PCR quantitativa
qRT-PCR	PCR quantitativa de RNA
SYBR Green	Fluoróforo para reações de PCR quantitativa
TAD	Teste de aglutinação direta
Taqman	Sonda molecular que detecta regiões específicas
TICs	Testes imunocromatográficos

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>08</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>09</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Aspectos gerais da leishmaniose .....</b>	<b>17</b>
2.1.1 Leishmanioses .....	17
2.1.2 Leishmaniose Visceral Humana (LVH) .....	18
<b>2.2 Aspectos clínicos e doença grave .....</b>	<b>19</b>
2.3 Proteína de choque térmico (HSP70) e modulação parasita/ hospedeiro .....	20
2.4 Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Humana .....	22
2.4.1 Exame direto.....	23
2.4.2 Diagnóstico sorológico .....	24
2.4.3 Técnicas moleculares e novas perspectivas para o diagnóstico de calazar .....	26
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>41</b>
<b>ARTIGO 1 – Avanços no diagnóstico laboratorial do Calazar.....</b>	<b>42</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>56</b>
ARTIGO 2 – Quantificação de RNAm do gene <i>HSP70</i> de <i>Leishmania infantum</i> no sangue de pacientes com Leishmaniose Visceral .....	57
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>72</b>
ARTIGO 3 – Validação de PCR em tempo real baseado nos sistemas SYBR Green e TaqMan utilizando sangue de pacientes com calazar em região endêmica .....	73
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE I.....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>105</b>

## APRESENTAÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença negligenciada, urbana, quase sempre aguda ou sub-aguda, que acomete principalmente populações de países tropicais e sub tropicais. No cenário nacional, o Estado do Piauí, juntamente com o Ceará, o Maranhão e o Pará são os entes federativos com maior número de casos. O Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP), sediado na cidade de Teresina, Piauí, recebe em média 300 a 400 casos de LV por ano, fato que levou pesquisadores deste Instituto a criarem o maior banco de dados e material biológico ao longo dos últimos 15 anos, tornando, por conseguinte, este citado centro uma referência nas pesquisas de LV grave.

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstram que a quantificação de DNA super estima a parasitemia de pacientes com LV, provocando DNAemia. Este fato reduz a acurácia de ensaios moleculares e reduz a determinação de infectividade. Diante desse problema, novos métodos de quantificação devem ser desenvolvidos e propusemos estudar a quantificação de RNAm de HSP70 em pacientes com LV. Ensaios com RNAm podem determinar de forma mais fiel a quantidade de parasitas circulantes e determinar a infectividade.

Neste contexto, este trabalho é dividido em capítulos no formato de artigos que contemplam metodologia, resultados e discussão. A tese apresenta inicialmente uma revisão bibliográfica, seguida pelo capítulo 1 descrito no artigo 1 sobre métodos de diagnóstico de LV, capítulo 2 descrito no artigo 2 que demonstra a presença de RNAm em pacientes com LV e, por fim, apresentaremos o capítulo 3 descrito no artigo 3 que compara sensibilidade e especificidade de métodos de quantificação de DNA e RNA, bem como, cultura *in vitro* e teste rápido rK39 para fins de diagnóstico de LV.

## 1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são doenças tropicais, negligenciadas, transmitidas por vetores, causada pelo protozoário intracelular obrigatório, *Leishmania* (L.) as quais são transmitidas pela picada do inseto vetor da família *Psychodidae*, da subfamília *Phlebotominae* (BRAZUNA et al., 2012).

Gil-Prietro et al. (2011) mostram que as leishmanioses possuem grande espectro de manifestações clínicas que diferem de acordo com o gênero envolvido. Existem duas formas clínicas principais dessa doença, a cutânea, que afeta a pele e mucosas, e a sistêmica ou visceral, que pode levar a formas graves e a complicações fatais quando não tratadas.

Os protozoários do gênero *Leishmania* tem preferência pelas células do sistema fagócito mononuclear, os macrófagos, onde se dividem e diferenciam, acometendo, principalmente órgãos como o baço, medula óssea, linfonodos e fígado (MENEZES, 2014; SANTOS, 2014).

A Leishmaniose Visceral (LV), conhecida como calazar, é uma zoonose que gera um grave problema de saúde pública e coletiva, por ter uma ampla distribuição territorial com grandes taxas de incidência e de mortalidade (LEITE; ARAUJO, 2013; CAVALCANTE; VALE, 2014).

A Leishmaniose Visceral Humana (LVH) é a forma mais grave das leishmanioses, caracterizando-se por febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, pancitopenia, anemia e perda de peso progressiva. Quando não tratada, pode ser fatal (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Historicamente reconhecida como uma doença rural, a LV surgiu ao lado de um contínuo processo de urbanização, que vem ganhando território, agravando-se a partir da década de 1980 (COSTA et al., 1990) devido às interferências nos ecossistemas naturais (MARTINS et al., 2013).

No Brasil, a LVH é avaliada como doença endêmica, ocorrendo surtos frequentes durante todo o ano, principalmente em áreas urbanas (BARBOSA, 2013). Sua ocorrência se dá principalmente, em áreas tropicais, sendo mais prevalente na região Nordeste, incluindo o estado do Piauí, entre os de maior incidência (DRUMOND; COSTA, 2011). Neste estado, como em outros, há carência de políticas de prevenção e diagnóstico, revelando, assim, a importância quanto ao estudo de novas técnicas metodológicas, bem como ações preventivas.

O surgimento de novas tecnologias para diagnóstico vem resultando no aumento da acurácia de métodos de diagnóstico, tornando os pacientes, beneficiários em potencial de um tratamento mais eficaz quando diagnosticados precocemente (BARBOSA, 2013).

O diagnóstico para a LV compreende achados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos (SOUZA; SOUZA; BOTELHO, 2012). A determinação laboratorial da leishmaniose se constitui fundamentalmente de três exames, parasitológico, imunológicos e os moleculares (BRASIL, 2014).

O exame parasitológico consiste na pesquisa microscópica das formas amastigotas em medula óssea, xenodiagnóstico, isolamento em cultivo *in vitro* (RODRIGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2006).

Quanto aos exames imunológicos, o Ministério da Saúde recomenda a utilização dos ensaios de ELISA (Ensaio de Imunoadsorção Enzimático) e Imunofluorescência Indireta. Entretanto, esses não são rotineiramente utilizados devido a alta complexidade de aplicação e interpretação. Ademais, a sensibilidade e a especificidade podem ser afetadas pelo estado imunológico do paciente. Não raro, ocorrem casos de coinfeção pelo vírus HIV-1, corroborando para a imunossupressão dos pacientes, tornando os ensaios sorológicos não recomendados para diagnóstico de LV (LE MOS, 2014).

Os ensaios moleculares são considerados padrão ouro para diagnósticos clínicos e se baseiam na análise do DNA do parasito, o qual, por meio da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), amplificam quantidades mínimas do material genético do parasito presente. Esses métodos moleculares apresentam melhor sensibilidade e maior especificidade que as técnicas tradicionais de diagnóstico e tem sido utilizadas com sucesso na detecção de infecção assintomática, no diagnóstico e no acompanhamento de pacientes, uma vez que é capaz de identificar recaídas e reinfecções naqueles já tratados (FUKUTANI et al., 2014).

A Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) é a técnica mais promissora para diagnóstico e o indicador de infectividade. Já foi aplicada à amplificação DNA de parasitas presentes na pele e no sangue, mas não se sabe precisamente qual dos dois tecidos é a principal fonte das amastigotas que serão transmitidas para o vetor. Além disso, não se sabe exatamente o que as estimativas das quantidades medidas pelo método realmente representam, se parasitas viáveis para transmissão ou se apenas DNA circulante oriundo de outros tecidos (REITHINGER et al., 2003).

Segundo Silva et al. (2016), a quantidade de DNA de leishmania circulante em sangue periférico e de plasma de pacientes pode representr tanto parasitas viáveis quanto parasitas inviáveis, esse produto de degradação de parasitas mortos contribuiu para “DNAemia”. Nesse sentido, novas estratégias para demonstrar a presença de desses parasitas em sangue e determinar a infecciosidade vêm sendo adotadas (MILLER et al., 2014; SEBLOVA et al., 2013; KIRSTEIN et al., 2017). Nesta perspectiva, pesquisas com RNA circulante no sangue

vem demonstrando ser um campo emergente para diagnóstico não invasivo, devido a sua característica lábil, sua presença em fluidos biológicos representa atividade transcricional celular (MARQUES et al., 2012). Transcritos de RNA também podem ser usados como biomarcadores (PELLEGRINI et al., 2015; XU et al., 2016; IMAMURA et al., 2016) e ensaios de quantificação de RNAm podem expressar, de forma mais fidedigna, a presença de parasitas viáveis para infecção.

Este estudo teve por objetivos: 1. Utilizar o RNAm do gene HSP70 como método de identificação de amastigotas de *Leishmania infantum*, demonstrando a presença de parasitas viáveis; 2. Quantificar os níveis de RNAm do gene HSP70 como método de diagnóstico e de infectividade.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais da leishmaniose

#### 2.1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são enfermidades infecciosas causadas por diferentes espécies de protozoários digenéticos da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*. Constituem um grave problema de saúde pública, representando um complexo de doenças com diversidade epidemiológica e importante espectro (NOBRES; SOUSA; RODRIGUES, 2013). As formas da doença estão relacionadas à espécie do parasito infectante, que diferem na distribuição geográfica, nos insetos vetores e nos hospedeiros vertebrados. A incidência e mortalidade estão associadas a estes fatores (LOBO et al., 2013).

De acordo com Alvarenga et al. (2010) e Batista et al. (2014), as leishmanioses compreendem um espectro de doenças com distribuição mundial em regiões subtropicais e tropicais, com capacidade de adaptação em diferentes ecossistemas. No mundo, estão entre as seis endemias consideradas mais importantes, caracterizando um grupo de enfermidades responsáveis por um grave problema de saúde pública em muitos países.

As leishmanioses são classicamente divididas em Leishmaniose Tegumentar e Leishmaniose Visceral, que são causadas por espécies diferentes de parasito. A infecção, nas duas formas, é caracterizada por acometer a pele, as mucosas ou as vísceras (FARIA; ANDRADE, 2012; NOBRES; SOUSA; RODRIGUES, 2013; SANTOS, 2014).

As leishmanias (L.) apresentam-se de duas formas em seu ciclo de vida; forma promastigotas, flagelada, presente no tubo digestivo do vetor flebotomíneo – *Lutzomyia longipalpis*, e na forma amastigota, nos hospedeiros vertebrados – canídeos silvestres (*Cerdocyon* e *Dusicyon*) e domésticos (*Canis familiaris*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) (OLIVERIA 2001 apud DEANE; DEANE, 1962).

Para Brazuna (2012), o intercâmbio entre os ciclos silvestre e doméstico desses hospedeiros podem ser mantido por apresentarem um hábito sinantrópico.

A transmissão da LV ocorre por meio da picada de fêmeas do flebotomíneo, no momento do repasto sanguíneo, quando picam um animal infectado, sugam o sangue contendo as formas amastigotas, as quais, após atingirem o tubo digestivo, transformam-se em formas promastigotas e se multiplicam intensamente. Em seguida, migram para a probóscida do flebotomíneo, que, ao picar outro animal, poderá regurgitar as formas

promastigotas metacíclicas infectantes. Essas formas serão fagocitadas por macrófagos, que irão se diferenciar em amastigotas e se multiplicar, dando continuidade ao ciclo do parasita.

Segundo Marzochi et al. (1994), de todos os potenciais hospedeiros da LV causada por *L. chagasi* e *L. infantum*, o cão doméstico é importante na transmissão da doença ao homem. Já a *L. donovani* é antroponótica nas regiões da Índia e Sudão, onde o principal reservatório é o próprio homem (MARQUES, 2012; SILVA et al., 2013; FAVARO, 2014).

### 2.1.2 Leishmaniose Visceral Humana (LVH)

A LV, é uma doença crônica e negligenciada, potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui um tratamento adequado. É causada por *L. donovani* e *L. Infantum* (LOBO et al., 2013; MATSUMOTO; LIMA; CASAGRANDE, 2013; ORTIZ; ANVERSA, 2015).

Suas diferentes formas clínicas constituem um grave problema de saúde pública e são dependentes da espécie infectante do parasito e da resposta imune do hospedeiro (BEZERRA; TEIXEIRA, 2001).

No Brasil, a importância da LVH reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada ao quadro de má nutrição e de infecções concomitantes (GONTIJO; MELO, 2004).

A LV é endêmica, está presente em 98 países. Os principais locais de infecção são: sudoeste asiático, oeste da África e continente americano, em especial, no Brasil. Alterações ecológicas e demográficas, destruição de florestas primárias, grande crescimento populacional e criação de novos povoados rurais vêm alterando o ciclo silvestre do parasito (GOES; MELO; JERALDO, 2012; LOBO et al., 2013; KUMARA, 2008). O desmatamento, o aquecimento global e a adaptação dos vetores a novos ambientes tornam mais fácil que se encontrem flebotomínios nas regiões urbanas e, conseqüentemente, causam o aumento de infecções em animais e em homens (MENDES, 2013).

O Brasil é responsável por 90% dos casos de LV registrados na América Latina, sendo considerado, a terceira maior ocorrência no mundo, e a região Nordeste apresenta o maior número de casos registrados (FUNASA, 1998).

Entre os anos de 2006 a 2008, a transmissão autóctone da LVH foi relatada em mais de 1.200 municípios, em 21 estados. Em 2007, 50% dos casos ocorreram na região Nordeste. É considerada uma das mais acentuadas doenças causadas por parasitas, devido ao seu elevado grau de infectividade (MOURA, 2014). De acordo com Ortiz e Anversa (2015), no



território brasileiro, a doença alcançou uma taxa de letalidade de 5,8%.

Após o registro da primeira epidemia urbana em Teresina, no Piauí (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990), houve uma expansão para novas localidades nas regiões Nordeste, Norte e Sudeste, caracterizando um processo de urbanização da transmissão (GONTIJO; MELO, 2004). Devido aos grandes impactos ambientais e demográficos atribuídos ao homem, a LVH tem se apresentado como uma doença em dinamismo, principalmente no que se refere às circunstâncias de transmissão que vêm acontecendo continuamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

No Brasil, a LVH é avaliada como doença endêmica, ocorrendo em surtos frequentes durante todo o ano, tendo como consequência a migração de pessoas infectadas, além do crescimento urbano acelerado. Nesse panorama, o foco das pesquisas está na aquisição de novos métodos de diagnóstico e no planejamento de estratégias para controle. O período entre a infecção e o aparecimento da infectividade; a relação entre sintomatologia, imunologia e parasitemia com a infectividade; e a sensibilidade dos testes diagnósticos são importantes no controle epidemiológico (BARBOSA, 2013).

## **2.2 Aspectos clínicos e doença grave**

O protozoário *Leishmania* tem preferência pelas células do sistema fagócito mononuclear, local em que dividem e se diferenciam, acometendo, dessa forma, principalmente órgãos como o baço, a medula óssea, os linfonodos e o fígado (MENEZES, 2014; SANTOS, 2014).

Indivíduos infectados podem apresentar sintomas leves ou acentuados, incluindo febre irregular, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia e perda de peso (MOREIRA, 2012). Com a evolução da doença, novos sintomas podem surgir, destacando-se diarreia, vômito, icterícia, além de edema periférico. Esses indícios acabam por dificultar a identificação da LVH, por serem manifestações comuns a outras patologias (OLIVEIRA et al., 2010). De acordo com Silva et al. (2015), nas últimas décadas, a LV vem sendo considerada uma infecção oportunista em pacientes imunocomprometidos, incluindo receptores de transplante.

A evolução clínica da LV apresenta desfechos diversos. A maioria dos pacientes tem os sinais clássicos, como febre e anemia. Outros, contudo, apresentam complicações que são consequência da própria fisiopatologia, como também de infecções bacterianas diversas adquiridas, tais como pneumonia, infecção urinária e abscessos cutâneos. Outros têm sangramentos, hepatite, insuficiência respiratória e edema (COSTA et al., 2001; WERNECK

et al., 2003). A emergência da leishmaniose em novas áreas geográficas e em novos hospedeiros tem mudado o perfil clínico dos pacientes infectados e, assim, gerado novos desafios para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, tratamento e controle da doença (SUNDAR; RAI, 2002).

Atualmente, sabe-se que mesmo em tratamento, por razões desconhecidas, alguns pacientes evoluem com sangramento intenso, coinfeções bacterianas, dispneia, edema (membros inferiores ou anasarca) e icterícia que levam à morte, mesmo quando tratados com terapias recomendadas. Isso não se dá devido às diferentes espécies de parasitas, uma vez que a doença é causada por duas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, mas por expressão de genes específicos que podem tornar as cepas mais virulentas (COLLINS et al., 2004).

Os mecanismo de virulência do parasita foi demonstrado por Alonso et al. (2007) que constataram que a expressão de genótipos do gene MBL2 (lecitina ligante a manana) pode ser útil para estimar o risco de desenvolvimento de LVH e, uma vez que os pacientes desenvolvem LV, aumenta o risco de desenvolver anemia grave e outras complicações. Além disso, verificou que os baixos níveis de MBL podem proteger contra a progressão da doença na infecção por *L. chagasi*.

Os achados laboratoriais característicos são anemia normocrômica e normocítica, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia, aumento das transaminases, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia policlonal. Apesar do tratamento adequado, a recidiva da LV pode ocorrer após 6-12 meses. Quando não tratada, pode produzir doença multissistêmica, provocar suscetibilidade a infecções secundárias e levar à morte (MANSUETO et al., 2014).

Segundo Sampaio et al. (2010), verificaram que os pacientes que morreram de calazar apresentaram, de forma acentuada, anemia, hepatite, pneumonite, nefrite, diarreia, neutropenia, trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada. As formas graves da doença estão associadas às manifestações clínicas desencadeadas por citocinas inflamatórias. Costa et al. (2005) relataram associações entre citocinas e sinais clínicos do calazar grave. As citocinas que se apresentaram e associadas foram IL-6, interferon-gama e IL-8 estão de forma independente e diretamente associados à morte, particularmente entre os jovens.

### **2.3 Proteína de choque térmico (HSP70) e modulação parasita/ hospedeiro**

Algumas proteínas são diferencialmente expressas em infecções ativas na LVH, como as proteínas de choque térmico (HSPs), que são moléculas altamente conservadas e desempenham papel importante no enovelamento de proteínas, na combinação de complexos protéicos e na translocação de proteínas através dos compartimentos celulares. Por apresentarem essas funções auxiliares, as Hsps também foram denominadas chaperomas moleculares (RICO et al., 2002).

A literatura relata o importante papel das HSPs em vários processos imunológicos, pois desempenham função mitógena para células B e estão envolvidos nas vias de processamento e apresentação de antígenos. Por esse motivo, as HSPs podem funcionar como uma espécie de ligação entre respostas imunes inatas e adaptativas. As sequências de HSPs são altamente conservadas ao longo da evolução, e foi proposto o reconhecimento de epítomos compartilhados pela proteína em diferentes patógenos, fornecendo assim, ao sistema imunológico, um sinal universal de infecção (RICO et al. 2002, apud SRIVASTAVA et al., 1998; ANDERSON; SRIVASTAVA, 2000).

Outro aspecto interessante relatado da HSP70, é o fato de representam antígenos proeminentes durante o curso de doenças infecciosas causadas por bactérias, protozoários, fungos e nematoides, sendo a família da HSP70 comum em soro de pacientes com LV.

Nas leishmanioses é provável que as HSPs desempenhem papéis importantes na diferenciação de promastigotas em amastigotas, durante a infecção em hospedeiros mamíferos. Estas proteínas parecem estar envolvidas na adaptação e sobrevivência da célula ao calor e a outras condições de estresse oxidativo (MIRAHAMADI et al., 2016; RAMIREZ et al., 2011).

Devido a sua sequência conservada, o gene de HSP70 vem sendo utilizado por diversos pesquisadores para diagnóstico e rastreo de agentes etiológico das leishmanioses. Auwera et al. (2013) constataram em estudos moleculares, utilizando o gene de HSP70, que as espécies de *L. Infantum* e *L. Chagasi* possuem várias regiões similares, demonstrando se tratar da mesma espécie nas Américas. Através de PCR-RFLP de DNA, Nemati et al. (2017) distinguiram as espécies de LV, demonstrando que os casos humanos notificados no Iran eram promovidos pela espécie *L. infantum*. Mirahamadi et al. (2016) apontaram que a utilização do gene de HSP70 para rastreo por PCR-RFLP vem ganhando notoriedade devido à sua menor taxa de diversidade genética em relação a outros marcadores, como gp63 ou genes rDNA ITS, demonstrando ser um bom alvo de rastreo e diferenciação entre as espécies de leishmania.

Outros estudos, de Boni et al. (2017) e Rastaghi et al (2017) relataram que HSP70 é

um bom alvo molecular para diagnóstico de LV, devido a melhores resultados de sensibilidade e especificidade em PCR quantitativa. Monteiro (2014) demonstraram a presença de *L. infantum* em isolados de cães com LV através da triagem de HSP70 I. Constatando que HSP70 é eficiente no diagnóstico e identificação de espécie do gênero *Leishmania*, validando a PCR como método diagnóstico conclusivo e eficaz.

Em estudos sorológicos, Oliveira (2001) apontou que a elevada especificidade pode ser explicada devido as seqüências de aminoácidos encontradas na fração carboxi-terminal das HSP70 por serem pouco conservadas. De fato, embora a parte amino-terminal destas proteínas seja extraordinariamente conservada, os fragmentos C-terminais das HSP70 têm em geral menos de 65% de homologia entre espécies não aparentadas. Este fato pode explicar a resposta imune discriminatória com produção de anticorpos específicos contra esta proteína parasitária. Este evento foi confirmado por Fonseca (2013) que demonstrou boa sensibilidade e especificidade em ensaios sorológicos utilizando as proteínas de HSP70. Fato também observado por Talmi-Frank et al (2006), que demonstraram o poder diagnóstico da proteína HSP70 em cães com LV, determinando que esta proteína pode ser um biomarcador de infecção ativa.

#### **2.4 Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Humana**

A medicina tem buscado progresso nas formas de diagnóstico, rápidos e eficazes, visando à segurança do paciente (MATSUMOTO; LIMA; CASAGRANDE, 2013; MENEZES, 2014). Algumas enfermidades gozam de diferentes meios de reconhecimento, tendo isso como vantagem, desde que eles sejam utilizados da melhor maneira possível, já que, dependendo do grau de evolução da doença, pode-se ter um método mais eficaz para o diagnóstico preciso (SOUZA; SOUZA; BOTELHO, 2012).

O Ministério da Saúde, atualmente, recomenda que o diagnóstico laboratorial da LVH seja baseado no exame parasitológico ou sorológico (BRASIL, 2014). No entanto, devido à maior rapidez e ao menor custo, os testes sorológicos são os mais empregados pelos programas de controle. De maneira geral, o diagnóstico da LV vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública, principalmente devido à inexistência de um teste 100% específico e sensível (SOLANO-GALLEGO et al., 2001).

O reconhecimento da doença pode ser confirmado por diversas formas: (i) por visualização direta de parasitos em amostras de tecido e cultura; (ii) por detecção de ácido desoxirribonucleico (DNA e RNA) em amostras de tecido; ou (iii) pelo imunodiagnóstico, por

meio da detecção de antígenos do parasito em amostras de tecido, sangue e urina ou da detecção de anticorpos antileishmânia (SUNDAR; RAI, 2002). Os exames parasitológicos constituem a referência do diagnóstico, mas exigem procedimentos invasivos e têm sensibilidade dependente do treinamento dos laboratoristas e do tempo dedicado à busca ativa (PRATA; SILVA, 2005).

#### **2.4.1 Exame direto**

A microscopia óptica tem alta especificidade, podendo ser observadas formas amastigotas nos tecidos do fígado, medula óssea, linfonodos e/ou baço. Na ocasião, é usada coloração Giemsa, que colore o citoplasma das amastigotas em azul e o núcleo em vermelho. Com isso, a identificação do parasita em amostras biológicas continua sendo considerada o “padrão ouro”, apesar das limitações habituais (FONSECA, 2013).

As amostras provenientes do baço são consideradas mais sensíveis (entre 95% a 98%) em relação às da medula óssea e linfonodos (BRAZUNA, 2012). Elas têm como desvantagem a forma de coleta amostral dolorosa, que exige procedimentos invasivos com complicações potencialmente graves, mesmo com as técnicas consideradas mais seguras (PRATA; SILVA, 2005). Se a doença estiver no período inicial ou em indivíduos assintomáticos, podem ser obtidos possíveis resultados falso-negativos (LEMOS, 2014).

Sakkas, Gartzonika e Levidiotou (2016) mostraram, em seus estudos, que a biópsia hepática é mais segura, embora seja menos sensível em comparação à aspiração esplênica. A aspiração da medula óssea é um método mais seguro do que a esplênica e a biópsia hepática, mas é menos provável que demonstre parasitas no esfregaço corado. A sensibilidade varia de 53% a 86%, mas é maior em pacientes coinfectados com HIV-1. A aspiração de nódulos linfáticos tem valor diagnóstico, especialmente quando são observados gânglios linfáticos aumentados, com sensibilidade entre 52% e 58%. A menor sensibilidade desse método é observada em esfregaços de sangue periférico, uma vez que a parasitemia em indivíduos imunocompetentes é baixa.

As amostras clínicas também podem ser cultivadas em meio de cultura monofásico (meio de insecto de Schneider, M199, ou meio de Grace) ou difásico (meio Novy-McNeal-Nicolle e meio de Tobie modificado por Evans). Após incubação a 22 - 28°C, as culturas são examinadas semanalmente, durante quatro semanas, até que os amastigotas se transformem em promastigotas. A cultura de aspirados esplênicos ou de medula óssea tem alta especificidade, embora seja tediosa, demorada, requerendo experiência e equipamentos caros

e, portanto, sendo restrita aos centros de pesquisa de referência e aos hospitais (BOLEART et al., 2007; SRIVIDYA et al., 2012). A sensibilidade diagnóstica pode ser melhorada com o desenvolvimento do método de microcultura, tornando o método mais sensível para o isolamento do parasita. Pode ser usado também o creme leucocitário de sangue periférico isolado de pacientes com LVH, com boa sensibilidade (ELMAHALLAWY et al., 2014).

Raramente utilizados, parasitas obtidos em cultura geralmente são utilizados como fonte de antígenos para testes imunológicos, inoculação em animais, rastreio *in vitro* de fármacos e acurácia do diagnóstico na suplementação de outros métodos de rotina (SUNDAR; RAI, 2002).

#### **2.4.2 Diagnóstico sorológico**

Os métodos para diagnóstico sorológico da LVH, são variados, devido à alta produção de anticorpos (DA SILVA, 2010). Chappuis et al. (2007) relataram que, ao longo dos últimos anos, numerosos antígenos recombinantes têm sido utilizados nesse tipo de reconhecimento da LVH, uma vez que o uso deles na forma bruta é limitado. Dentre os testes, destacam-se: Teste de Aglutinação Direta (DAT); Teste Indireto de Anticorpos Fluorescentes (IFAT); Teste de Hemaglutinação Indireta (IHA); Ensaio Imunoenzimático (ELISA); e Testes Imunocromatográficos (TICs).

Em virtude do grande número de infectados, vários exames não invasivos, com especificidade e sensibilidade diversas, foram desenvolvidos e estão disponíveis para o diagnóstico de leishmaniose, por exemplo, por meio da detecção de anticorpos (ELISA, hemaglutinação indireta, fixação do complemento, imunodifusão) e antígenos do parasita (SUNDAR; RAI, 2002).

Os testes sorológicos são mais comumente utilizados para o diagnóstico da LVH e, em geral, são altamente sensíveis, mas a especificidade desses métodos pode variar, dependendo da capacidade imunológica do paciente (RYAN et al., 2002). Anticorpos antileishmania permanecem detectáveis por meses ou anos após o tratamento. Portanto, a recaída da infecção é difícil de ser diagnosticada. Além disso, as comparações de vários testes sorológicos geralmente demonstram baixos níveis de concordância com os resultados obtidos em indivíduos assintomáticos em regiões endêmicas (SILVA et al., 2011). Ademais, em áreas endêmicas, indivíduos saudáveis podem ser positivos nesses testes de detecção de anticorpos antileishmania, devido à infecção assintomática ou à eliminação incompleta do parasita em infecções passadas (GIDWANI et al., 2011).

Além disso, na coinfeção de *Leishmania* com HIV-1, os métodos sorológicos mostram baixa sensibilidade, pois a determinação de anticorpos é difícil devido à ação imunossupressora do vírus. Métodos para a detecção do antígeno leishmaniano em amostras de urina também foram avaliados com resultados variados (SAVOIA, 2015).

O Teste de Aglutinação Direta (DAT) é semiquantitativo, simples, confiável, econômico e tem sido amplamente validado na maioria das áreas endêmicas, particularmente em países em desenvolvimento (ELMAHALLAWY et al., 2014). O antígeno geralmente consiste em promastigotas, e o teste pode ser realizado em soro, plasma e sangue total (MOODY; CHIODINI, 2000). O método tem a vantagem de detectar baixos níveis de anticorpos devido ao mosaico dos antígenos utilizados, alguns dos quais, podem ser reativos cruzados. Portanto, é necessária atenção na determinação dos valores de corte para um teste positivo (MAIA et al., 2012). Entretanto, o valor de corte não deve se basear apenas na sensibilidade e na especificidade, pois os valores preditivos do teste também dependem do contexto epidemiológico e da prevalência da infecção. De acordo com a metanálise de Akhound et al. (2010), a sensibilidade e a especificidade do DAT foram estimadas em 94,8% e 97,1%, respectivamente, enquanto o desempenho do método não foi influenciado pela região ou pelas espécies do parasita.

O DAT possui baixo custo e a execução é simples, sendo bastante sensível e específico, possui efeito visível e não necessita de equipamentos sofisticados (ASSIS, 2012; LEMOS, 2014). Entretanto, apresenta desvantagem em relação à espera para obtenção do resultado, ao alto custo do antígeno, às numerosas pipetagens e à difícil uniformização do antígeno empregado (BRAZUNA, 2012).

Outro teste bastante utilizado é o teste Rápido Imunocromatográfico, que faz uso do antígeno recombinante rk39 fixado em papel, reconhecendo os anticorpos específicos para leishmania. Este teste é rápido, específico, sensível, com alta reprodutibilidade, sendo usado para estudos de triagem em campo, diferentemente dos demais testes citados (SOUZA; SOUZA; BOTELHO, 2012). Contudo, apresenta ineficácia em certas regiões do mundo, como na África, onde os indivíduos infectados apresentam baixos valores de anticorpos contra o rk39 (FONSECA, 2013).

Lemos (2014) apontaram que o Teste de Aglutinação do Látex (KAtex) pode ser usado para a detecção de antígenos de leishmania na urina, preferencialmente em pessoas com sistema imune comprometido, entretanto necessita de grande volume de urina, para evitar falsos negativos. O antígeno pode ser detectável no período de um à seis meses após o tratamento. O método é apropriado para o diagnóstico de LVH primária, para monitorar a

eficácia do tratamento e para a detecção de infecção subclínica. O KAtex apresenta satisfatório valor preditivo positivo, alta especificidade de 82% a 100% e sensibilidade variável de 47% a 95% (SUNDAR et al., 2005; CRUZ et al., 2006).

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) já foi considerada o padrão ouro no diagnóstico para a LVH, mas sua utilidade vem diminuindo, devido à necessidade de equipamentos caros e sofisticados. Quando utilizada, em serviços de saúde ligados a universidades, o diagnóstico faz-se em estágio inicial da leishmaniose, havendo limitações em relação à especificidade e à sensibilidade, podendo haver reação cruzada com os antígenos da doença de chagas ou outras doenças parasitárias (BRAZUNA, 2012).

O ELISA é o método mais utilizado e recomendado pelo Ministério da Saúde, pois é capaz de processar várias amostras ao mesmo tempo, tendo alta sensibilidade e sendo usado, inclusive, em triagens epidemiológicas. Este método faz uso de diversos tipos de antígenos, os quais aumentam sua sensibilidade e sua especificidade. Os mais usualmente utilizados são os antígenos brutos ou solúveis, mas há a possibilidade de reação cruzada com antígenos semelhantes pertencentes a outras doenças (XAVIER, 2014).

Para Chappuis et al. (2007), os testes de ELISA e de RIFI não são totalmente empregados em campo por falta de adaptação. Vários autores propõem o DAT e o teste rápido rK39 como os métodos mais apropriados para o diagnóstico sorológico de LVH no campo. Entretanto a sensibilidade do teste rápido rK39 é reduzida em populações da África Oriental.

### **2.4.3 Técnicas moleculares e novas perspectivas para o diagnóstico de calazar**

Nos últimos anos, a genética, a biologia celular, o sequenciamento do genoma de patógenos, dentre outros fatores, têm mudado, de forma significativa, os estudos diagnóstico, epidemiológico e de controle de doenças (YANG; ROTHMAN, 2004).

De acordo com Fonseca (2013), a técnica molecular mais empregada é a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), a qual faz uso de diversos materiais clínicos, como medula óssea, soro, urina, sangue total, pele, linfonodo, dentre outros. Ela utiliza alvos moleculares, fazendo com que um fragmento específico da molécula de DNA seja amplificado diversas vezes em pouco tempo. Essa técnica permite a detecção e a análise de sequências amplificadas. Tendo conhecimento prévio da sequência-alvo, faz-se a síntese de dois primers que servirão de iniciadores para sintetizar a sequência-alvo em dois sentidos. Então, a enzima polimerase reconhece esses primers e inicia o processo de amplificação, formando cópias complementares às sequências de DNA, que estão sendo replicadas. A visualização do



produto da PCR é feita por meio de eletroforese em gel de agarose.

A PCR tem sido utilizada quando a microscopia e a sorologia são ineficazes, proporcionando, inclusive, o monitoramento pós-tratamento (DA SILVA, 2010). A PCR convencional mostra um amplo espectro de positividade em indivíduos saudáveis de regiões endêmicas. Entretanto, os resultados são semelhante à sorologia, e o mesmo é incapaz de diferenciar a doença clinicamente ativa de infecções assintomáticas. Essas desvantagens podem ser superadas quando aplicada a técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) (SUNDARSHAN; SUNDAR, 2014).

As variações da PCR convencional, como o Nested PCR, seminested-PCR e a PCR em tempo real (qPCR), têm sido demonstradas como importantes ferramentas diagnósticas (MOTAZEDIAN et al., 2008; PAIVA et al., 2015).

Estas técnicas vem sendo amplamente utilizadas em estudos relacionados à carga parasitária, à interação entre parasito e hospedeiro e ao monitoramento de esquemas terapêuticos, a partir de amostras clínicas provenientes de pacientes com leishmaniose. Pelo fato de não apresentar os vários passos de manipulação pós-amplificação utilizados na técnica de PCR convencional, a qPCR minimiza os riscos de contaminação do material, além de permitir de forma simultânea a detecção e a quantificação da carga parasitária (VITALE et al., 2004; MARQUES, 2012). Esse método tem sido utilizado com sucesso na detecção de infecção assintomática de leishmaniose e no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com LVH, uma vez que é capaz de identificar recaídas e reinfecções em pacientes tratados (FUKUTANI et al., 2014).

A qPCR permite, basicamente, a realização de três tipos de ensaios: quantificação absoluta, quantificação relativa e discriminação alélica (APPLIED BIOSYSTEMS, 2001), os quais possuem diferentes e variadas aplicações. Como ferramenta diagnóstica, a quantificação absoluta pode ser utilizada para a detecção da infecção e para a quantificação de seu agente etiológico. O ensaio se baseia na análise da curva-padrão (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

As características da qPCR possibilitam a eliminação da etapa laboriosa pós-amplificação (preparo do gel para eletroforese), convencionalmente necessária para a visualização do produto amplificado. Dessa forma, pode-se observar que as vantagens da qPCR em relação à PCR convencional são inúmeras e incluem rapidez na obtenção dos resultados, reprodutibilidade e capacidade quantitativa (SUNDSFJORD et al., 2004; YANG; ROTHMAN, 2004). Essa tecnologia, altamente sensível, é utilizada para diagnóstico quantitativo de diversas doenças infecciosas, tais como AIDS, hepatite C, dengue, toxoplasmose e as leishmanioses (BRETAGNE et al., 2001; SOLANO-GALLEGOS;

MORELL; ARBOIX, 2001; MARY et al., 2004).

O sistema da qPCR é baseado no uso de corantes ou sondas fluorescentes, que permitem o monitoramento em tempo real do produto amplificado. Um corante bastante utilizado é o SYBR Green I, que se liga inespecificamente a fitas duplas de DNA geradas durante a amplificação. Trata-se de uma assimétrica cianina que, livre em solução, não emite fluorescência, mas, ligada a moléculas de DNA, emite um forte sinal luminoso (NYGREN; SVANVIK; KUBISTA, 2006). Outra forma de gerar isso é pelo uso de uma sonda dirigida especificamente a uma região interna da sequência que se deseja amplificar, sendo um exemplo desse sistema a sonda TaqMan. À medida que vai ocorrendo a amplificação, a Taq polimerase, pela sua atividade exonucleásica, desloca a extremidade 5' da sonda TaqMan (contendo o fluorocromo, *reporter*) e cliva a sonda. Pelo fato de o *reporter* ser liberado e não permanecer próximo ao *quencher*, há a liberação de fluorescência (MORTARINO et al., 2004; YANG; ROTHMAN, 2004).

A análise da emissão de luz é feita por um detector de sinal luminoso e um amplificador de sinal que traçam um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo da qPCR, sendo que a intensidade do sinal gerado reflete a quantidade do produto formado (KUBISTA et al., 2006). O ciclo em que o sinal de amplificação exponencial atinge uma intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção (Threshold) é denominado Ciclo Threshold (Ct), e o momento em que o Ct é ultrapassado está diretamente relacionado à quantidade de DNA amplificado (MORTARINO et al., 2004). Ou seja, denomina-se Ct o ponto em que a emissão de fluorescência da amostra em teste supera a referência passiva do aparelho (*background*) (INSTITUTO FLEURY, 2004).

A qPCR permite estudos de quantificação de DNA e de RNA, possibilitando pesquisas com expressão gênica em determinados fluidos corporais ou tecidos. Um dos enfoques utilizados por essa técnica é a quantificação dos níveis de transcrição de RNAm, realizada pela reação em cadeia da polimerase da transcrição (RT-qPCR), envolvendo transcrição reversa, reação em cadeia da polimerase e análise em tempo real dos produtos da PCR (WINTER- FLOTER, 2010).

Peacock et al. (2007) relataram que os níveis de expressão gênica variam consideravelmente entre as espécies, o que pode estar relacionado com a patogênese de cada forma clínica das leishmanioses. Aproximadamente 8% dos genes parecem estar envolvidos nos processos metabólicos e nas diferenciações gerais entre as espécies, relacionando-se com a sobrevivência do parasito no hospedeiro e o surgimento da doença. A identificação desses genes espécie-específicos pode auxiliar no reconhecimento dos fatores parasitários que

influenciam a infecção.

Para isso, são utilizadas várias sequências alvo do DNA, incluindo DNA de cinetoplasto, RNAr, genes de RNA derivado de mini-exon, região génica de alfa tubulina, locus do gene glicoproteína 63 (gp63) e regiões intercalantes transcritas internas (ITS) (SRIVIDYA et al., 2012). A qPCR vem demonstrando sensibilidade de 100% a partir de iniciadores para DNA de cinetoplasto em amostras de sangue. A obtenção de sequências conservadas dentro do gene de cinetoplasto ou RNAr de leishmania é utilizada como forma de diagnóstico, especialmente na coinfeção por HIV-1, cuja carga parasitária pode ocasionalmente ser baixa (PACE, 2014).

Silva et al. (2016) demonstraram que, em sangue periférico de pacientes com LV, os níveis de DNA são superestimados, quando comparados ao número de parasitas por microscopia, evidenciando uma DNAnemia. A utilização de RNA poderia corrigir a quantificação de parasitas, vários estudos utilizam o RNAm como biomarcador de doenças, como descrito por Padmanabhan et al. (2012), o RNAm circulante no plasma/soro é um campo emergente para aplicações de diagnósticos não invasivos. Por meio de RT-PCR, pode-se detectar RNA de forma sensível, e o rastreio de RNAm de parasitas em sangue é um campo promissor no estudo diagnóstico de parasitas viáveis e de infectividade.

Nesse panorama, a RT-qPCR que utiliza transcriptase reversa proporciona a síntese do DNA complementar (cDNA) a partir de RNA mensageiro, por intermédio de uma enzima DNA polimerase RNA dependente, permitindo a quantificação da expressão génica (LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011).

Apesar de toda a tecnologia envolvida, o RT-qPCR apresenta limitações devido às variações de reagentes utilizados, bem como aos termocicladores, mas principalmente existem limitações em relação aos operadores profissionais, concentração e estabilidade do RNA em amostras biológicas (LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011).

Nesse sentido, novos ensaios moleculares, tais como o ensaio baseado em sequência de ácido nucleico (NASBA) e a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) são utilizadas para detecção de RNA de *Leishmania sp.* A NASBA é uma ferramenta poderosa, baseada na detecção de RNA de leishmania, que combina alta sensibilidade e especificidade e pode ser aplicada ao sangue e diferenciar outros espécimes de *Leishmania sp.* (BASIYE et al., 2010; MUGASA et al., 2010). O NASBA quantitativo (QT-NASBA) é uma variação do método que alveja o RNAr 18S, homólogo para todas as espécies de leishmania, aumentando seu valor diagnóstico. Além disso, Mugasa et al. (2010) demonstraram que o método NASBA tem maior eficácia do que a PCR convencional no Sudão, onde a parasitemia é baixa, com

sensibilidade e especificidade de 93,3 % e 100%, respectivamente. Saad et al. (2010) comparou a sensibilidade e especificidade dos ensaios de Oligo-C Teste para DNA e NASBA-OC para RNA que mostraram uma alta sensibilidade (>0,95%) na linfa, sangue e medula óssea dos pacientes no Sudão com LV confirmada. Entretanto a especificidade do NASBA-OC demonstrou ser maior que o OligoC-Test.

Tais técnicas são importantes para o diagnóstico das espécies e para identificar polimorfismos para genotipagem de várias espécies de leishmania (VERMA et al., 2013). Diante do exposto, como para alguns autores, a PCR tem sido previamente definida como “padrão-ouro”, sendo que a PCR quantitativa certamente será a técnica de referência no futuro (MARY et al., 2004).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHOUNDI, B. et al. Rapid detection of human *Leishmania infantum* infection: A comparative field study using the fast agglutination screening test and the direct agglutination test. **Travel Med Infect Dis.**, Amsterdam, v. 8, n. 5, p. 305-130, set. 2010.
- ALONSO, D. P., et al. Genotypes of the Mannan-Binding Lectin Gene and Susceptibility to Visceral Leishmaniasis<sup>[17]</sup> and Clinical Complications. **J Infect Dis.**, v. 195, p. 1212–1217, 2007.
- ALVARENGA, D. G. et al. Leishmaniose Visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Uberaba, v. 43, n. 2, p. 194-197, abr. 2010.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Real Time PCR Systems. **Absolute Quantification Getting Started Guide**. Atlanta: applied biosystems, 2005. Disponível em: <<http://www.appliedbiosystems.com/realtimelibrary>>. Acesso em: 20 março 2017.
- \_\_\_\_\_. **SDS Compendium 7000 SDS ver 2.1**. Atlanta: applied biosystems, 2001. Disponível em:< <http://www.appliedbiosystems.com.au/sdscompendiums.htm>.> Acesso em: 20 março 2017.
- ASSIS, T. S. M. **Avaliação de diferentes abordagens para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral humana**. 2012.115f. Tese (Doutorado em Ciências em Saúde) – Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2012.
- AUWERA, G. V., et al. Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics. **Euro Surveill.**, v. 18, n. 30, 2013.
- BARBOSA, I. R. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Rev Epidemiol Control Infecç.**, Santa Cruz do Sul, v. 3, n. 1, p. 17-21, mar. 2013.
- BASIYE, F., et al. Sensitivity and specificity of the *Leishmania* Oligo C-Test and NASBA-oligochromatography for diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya. **Trop Med Int Health**, v. 15, n. 7, p. 806–10, 2010.

BATISTA, F. M. A. et al. Leishmaniose: perfil epidemiológico dos casos notificados no estado do Piauí entre 2007 e 2011. **Revista Univap.**, São PAULO, v. 20, n. 35, p. 44-55, jan./nov. 2014.

BOLEART, M. et al. Evaluation of rapid diagnostic tests: Visceral leishmaniasis. **Nat Rev Microbiol.**, London, v. 5, n. 1, p. 30-36, jan. 2007.

BONI, S. M., et al. Efficiency of noninvasive sampling methods (swab) together with Polymerase Chain Reaction (PCR) for diagnosing American Tegumentary Leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop São Paulo.**, v. 59, e38, 2017.

BRASIL. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. 1. ed., 5. reimpr. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_viscer\\_al\\_1edicao.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer_al_1edicao.pdf)> Acesso em: 20 dez. 2017.

BRAZUNA, J. C. M. **Estudos sobre leishmaniose visceral humana e canina no município de Campo Grande, MS, Brasil**. 2012. 118f. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.

BRETAGNE, S. et al. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. **Clin Diagn Lab Immunol.**, Washington, v. 8, n. 4, p.828-831, jul. 2001.

BEZERRA, H. S. S.; TEIXEIRA, M. S. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) Salivary Gland Lysates on *Leishmania* (*Viannia*) *brasiliensis* infection in BALB/c Mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 3, p. 349-351, abr. 2001.

CAVALCANTE, I. J. M.; VALE, M. R. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral (calazar) no Ceará no período de 2007 a 2011. **Rev Bras Epidemiol.**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 911-924, dez. 2014.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol.**, London, v. 5, n. 11, p. 873-882, nov. 2007.

COLLINS, D. R. et al. Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. **Clin Infect Dis.**, Chicago, v. 38, n. 5, p. 612–619, mar. 2004.

COSTA, L. P. **Comportamento da fauna de flebotomíneos, com ênfase em *Lutzomyia longipalpis*, em área endêmica para Leishmaniose Visceral no município de Passira,**

**agreste de pernambuco.** 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de Leishmaniose Visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Rev Saúde Pública**, São Paulo, v. 24, n. 5, p. 361-372, out. 1990.

\_\_\_\_\_; VIEIRA, J. B. F. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Uberaba, v. 34, n. 2, p. 223-228, abr. 2001.

COSTA, M. L. et al. Levels of Th1 and Th2 cytokines in children with post-infectious bronchiolitis obliterans. **Ann Trop Paediatr.**, London, v. 25, n. 4, p. 261-6, dez. 2005.

CRUZ, I. et al. Coparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. **J Clin Microbiol.**, Washington, v. 44, n. 7, p. 2343-237, jul. 2006.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, São Paulo, v. 4, p. 198-212, mai./jun. 1962.

DRUMOND, K. O.; COSTA, F. A. L. Forty years of visceral leishmaniasis in the state of Piauí: a review. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 3-11, 2011.

ELMAHALLAWY, E. et al. Diagnosis of leishmania- sis. **J Infect Dev Ctries.**, Italy, v. 8, n. 8, p. 961-972, ago. 2014.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev Pan-Amaz Saude.**, Ananindeua, v. 3, n. 2, p. 47-57, jun. 2012.

FAVARO, A. B. B. B. C. **Conhecimento de diferentes populações sobre as leishmanioses: revisão sistemática.** 2014. 25f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharem em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Araçatuba, 2014.

FONSECA, A. M. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral utilizando proteínas de leishmania infantum com função desconhecida.** 2013. 74f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, 2013.

FUKUTANI, K. F. et al. Serological survey of Leishmania infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. **BMC Infect Dis.**, London, v. 14, n. 1, p. 422-430, jul. 2014.

FUNASA. **Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Leishmaniose Visceral (LV). In: Guia de Vigilância Epidemiológica.** Ministério da Saúde. 4. ed. Brasília: FUNASA, 1998.

GIDWANI, K. et al. Persistence of Leishmania donovani antibodies in past visceral leishmaniasis cases in India. **Clin Vaccine Immunol.**, Washington, v. 18, n. 2, p. 346-348, fev. 2011.

GIL-PRIETO, R. et al. Epidemiology of Leishmaniasis in Spain Based on Hospitalization Records (1997–2008). **Am J Trop Med Hyg.**, Northbrook, v. 85, n. 5, p. 820-825, nov. 2011.

GOES, M. A. O.; MELO, C. M.; JERALDO, V. L. S. Série temporal da Leishmaniose Visceral em Aracaju, estado de Sergipe, Brasil (1999 a 2008): aspectos humanos e caninos. **Rev Bras Epidemiol.**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 298-307, jun. 2012.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol.**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, set. 2004.

HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, Washington, v. 88, p. 7276-7280, ago. 1991.

IMAMURA, T., et al. Liquid biopsy in patients with pancreatic cancer: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. **World J Gastroenterol.**, v. 22, n. 25, p. 5627-5641, 2016.

INSTITUTO FLEURY. PCR quantitativo em tempo real (Real-Time PCR). Manual Fleury de Diagnóstico em Hematologia. **Fleury medicina e saúde**, 13 abri. 2004. Disponível em: <[www.institutofleury.org.br/educacao/manuais/manual\\_hemato/capitulo3b\\_impreso.htm](http://www.institutofleury.org.br/educacao/manuais/manual_hemato/capitulo3b_impreso.htm)>. Acesso em: 04 março 2017.

KIRSTEIN, O. D. et al. Minimally invasive microbiopsies: a novel sampling method for identifying asymptomatic, potentially infectious carriers of Leishmania donovani. **Int J Parasitol.**, Oxford, v. 47, n. (10-11), p. 609-616, set. 2017.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Mol Aspects Med.**, Oxford, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, abr./jun. 2006.

KUMARA. K. et al. Cutaneous leishmaniasis in Nepal: Leishmania major as a cause. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, London, v. 102, n. 2, p. 202-203, fev. 2008.

LADEIRA, P. R. S.; ISAAC, C.; FERREIRA, M. C. Reação em cadeia da polimerase da



transcrição reversa em tempo real/ Real-time reverse transcription polymerase chain reaction. **Rev Med.**, São Paulo, v. 90, n. 1, p. 47-51, jan./mar. 2011.

LEITE, A. I.; ARAUJO, L. B. Leishmaniose Visceral: aspectos epidemiológicos relacionados aos óbitos em Mossoró-RN. **Rev Patol Trop.**, Goiania, v. 42, n.3, p. 301-308, jul./set. 2013.

LEMOS, L. C. D. **Expressão heterológica da rKDDR de leishmania infantum**: um novo antígeno recombinante para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral. 2014. 100f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, 2014.

LOBO, K. S. et al. Conhecimentos de estudantes sobre Leishmaniose Visceral em escolas públicas de Caxias, Maranhão, Brasil. **Ciênc Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 8, p. 2295-2300, ago. 2013.

MAIA, Z. et al. Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with meta-analy- 40. sis. **Plos Neg Trop Dis.**, San Francisco, v. 6, n. 1, p.1484, jan. 2012.

MANSUETO, P. et al. Leishmaniasis in travelers: A literature review. **Travel Med Infect Dis.**, Amsterdam, v. 12, n. 6, p. 563-581, nov./dez. 2014.

MARQUES, A. R. **Co - infecção leishmaniose/HIV, a propósito de um caso clínico**. 2012. 43f. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, Porto, 2012.

MARQUES, L.H.S.; GOMES, L.I.; DA ROCHA, I.C.M.; DA SILVA, T.A.M.; OLIVEIRA, E.; MORAIS, M.H.F.; RABELLO, A.; CARNEIRO, M. Low Parasite Load Estimated by qPCR in a Cohort of Children Living in Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLOS Negl Trop Dis.**, v. 6, n. 12, e1955, 2012.

MARTINS, V. T. et al. Antigenicity and protective efficacy of a Leishmania amastigote-specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis.**, San Francisco, v. 7, n. 3, e2148, mar. 2013.

MARZOCHI, M. C. et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitol Today.**, v.10, n.1, Jan, p.37-40, jan. 1994.

MARY, C. et al. Quantification of Leishmania infantum DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. **J Clin Microbiol.**, Washington, v. 42, n. 11, p. 5249-55, nov. 2004.

MATSUMOTO, P. S. S.; DE LIMA, J.; CASAGRANDE, B. Leishmaniose Visceral no

estado de São Paulo: aplicações cartográficas e estatísticas. **Hygeia.**, São Paulo, v. 9, n. 7, p. 195-203, dez. 2013.

MENDES, T. A. et al. Identification of strain-specific B-cell epitopes in *Trypanosoma cruzi* using genome-scale epitope prediction and high-throughput immunoscreening with peptide arrays. **PLoS Negl Trop Dis.**, San Francisco, v. 31, n. 7, p. e2524, out. 2013.

MENEZES, J. A. **Leishmanioses: estudos epidemiológicos e o conhecimento da população de Formiga, Minas Gerais, Brasil.** 2014. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2014.

MILLER, E. A. et al. Quantifying the contribution of hosts with different parasite concentrations to the transmission of visceral leishmaniasis in ethiopia. **Plos Negl Trop Dis.**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. 3288, jan. 2014.

Ministério da Saúde. Brasil. 2006. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**, Brasília, 120 p.

MIRAHMADI, H., et al. Species Identification and Molecular Typing of *Leishmania* Spp. Using Targeting HSP70 Gene in Suspected Patients of Cutaneous Leishmaniasis from Sistan and Baluchestan Province, South-east Iran. **Iran J Parasitol.**, v. 11, n. 4, p.489-498, 2016.

MOODY, A.; CHIODINI, P. Methods for the detection of blood parasites. **Clin Lab Haem.**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 189-201, ago. 2000.

MONTEIRO, A. G. **Diagnóstico molecular e identificação das espécies de *Leishmania* na leishmaniose visceral canina no Distrito Federal, Brasil.** 2014. 43 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MOREIRA, E. A. **Aspectos hematológicos de pacientes com Leishmaniose Visceral.** São José do Rio Preto: Academia de Ciência e Tecnologia, Rua Bonfá Natale, Santos Dumont, 2012.

MORTARINO, M. et al. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. **Parasitol.**, Roma, v. 46, n. 1-2, p. 163-7, ju. 2004.

MOTAZEDIAN, M. et al. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. **Diag Microbiol Infect Dis.**, New York, v. 60, n. 2, p. 151-154, fev. 2008.

MOURA, L. M. A. de et al. Nível dos conhecimentos sobre as leishmanioses visceral e tegumentar pela população de alguns bairros de Teresina, Piauí, Brasil. **UNOPAR Cient., Ciênc Biol Saúde.**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 21-30, abr. 2014.

MUGASA, C., et al. Simplified molecular detection of Leishmania parasites in various clinical samples from patients with leishmaniasis. **Parasitol Vect.**, v. 3, p. 13, 2010.

NEMATI, S., et al. Genetic Diversity and Phylogenetic Analysis of the Iranian Leishmania Parasites Based on HSP70 Gene PCR-RFLP and Sequence Analysis. **Korean J Parasitol.**, v. 55, n. 4, p. 367-374, 2017.

NOBRES, E. S.; SOUZA, L. A.; RODRIGUES, D. J. Incidência de leishmaniose tegumentar americana no norte de Mato Grosso entre 2001 e 2008. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 43, n. 3, p. 297-303, set. 2013.

NYGREN, J.; SVANVIK, N.; KUBISTA, M. The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. **Biopolymers.**, New York, v. 46, n. 1, p. 39-51, jul. 1998.

OLIVEIRA, G. M. **APLICABILIDADE DE UMA FRAÇÃO CARBOXITERMINAL DA PROTEÍNA HSP70 PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.** 2001. 63 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.

OLIVEIRA, J. M. et al. Mortalidade por Leishmaniose Visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Uberaba, v. 43, n. 2, p. 188-193, abr. 2010.

ORTIZ, C. R.; ANVERSA, L. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral em Bauru, São Paulo, no período de 2004 a 2012: um estudo descritivo\*. **Epidemiol Serv Saúde.**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 97-104, mar. 2015.

PACE, D. Leishmaniasis. **J Infect.**, v. 69, Suppl 1, p. 10-8, nov. 2014.

PADMANABHAN, P. K. et al. Novel features of a PIWI-like protein homolog in the parasitic protozoan Leishmania. **PLoS One.**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. e52612, dez. 2012.

PAIVA, R. M. de et al. Amastin Knockdown in Leishmania braziliensis Affects Parasite-Macrophage Interaction and Results in Impaired Viability of Intracellular Amastigotes. **PLoS Pathog.**, San Francisco, v. 7, n.11, p. e1005296, dez. 2015.

PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. **Nat Genetics.**, New York, v. 39, p. 839-847, jan. 2007.

PELLEGRINI, K.L.; SANDAA, M.G.; MORENO, C. S. RNA Biomarkers to Facilitate the Identification of Aggressive Prostate Cancer. **Mol Aspects Med.**, v. 45, p. 37-46, 2015.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infeciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, v. 1, p. 713-732.

RAMÍREZ, C. A.; REQUENA, J. M.; PUERTA, C. O. J. Identification of the HSP70-II gene in *Leishmania braziliensis* HSP70 locus: genomic organization and UTRs characterization. **Parasit Vect.**, v. 4, p.166, 2011.

RASTAGHI, A. R. E., et al. Evaluative Assay of Nuclear and Mitochondrial Genes to Diagnose *Leishmania* Species in Clinical Specimens. **Iran J Public Health.**, v. 46, n.10, p.1422-1429, 2017.

REITHINGER, R., J. C. et al. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (viannia) spp.* in domestic dogs (*Canis familiaris*). **J Clin Microbiol.**, Washington, v. 41, n. 4, p. 1486-1493, jul. 2003.

RICO, A. I., et al. The heat shock proteins, Hsp70 and Hsp83, of *Leishmania infantum* are mitogens for mouse B cells. **Cell S Chap.**, v.7 n. 4, 339–346, 2002.

RODRIGUEZ-GONZÁLEZ, I. et al. Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. **Exp Parasitol.**, Orlando, v. 112, n. 1, p. 44-51, jan. 2006.

RYAN, J. R. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay based on 41. soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **J Clin Microbiol.**, Washington, v. 40, n. 3, p. 1037-1043, set. 2002.

SAAD, A. A., et al. Diagnostic Accuracy of the *Leishmania* OligoC-TesT and NASBA-Oligochromatography for Diagnosis of Leishmaniasis in Sudan. **PLOS Neg trop Dis.**, v. 4, n. 8, e. 776, 2010.

SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C.; LEVIDIOTOU, S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. **J Vector Borne Dis.**, New Delhi, v. 53, n. 1, p. 8-16, mar. 2016.

SAMPAIO, M. J. et al. Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis.**, San Francisco, v. 4, n. 11, p. 877, jul. 2010.

SANTOS, P. L. **Biomarcadores de patogênese e evolução clínica na Leishmaniose**

**Visceral humana.** 2014. 88f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Aracajú, 2014.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **J Inf Dev Ctries.**, Italy, v. 9, n. 6, p. 588-596, jul. 2015.

SEBLOVA, V. et al. Phlebotomus orientalis sand flies from two geographically distant Ethiopian localities: biology, genetic analyses and susceptibility to Leishmania donovani. **PLoS Negl Trop Dis.**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. -8, abr. 2013.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M.; MELO, M. N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical Leishmania species. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 21, p. 550-552, dez. 2005.

SILVA, L. A. et al. Antileishmania immunological tests for asymptomatic subjects living in a visceral leishmaniasis-endemic area in Brazil. **Am J Trop Med Hyg.**, Northbrook, v. 84, n. 2, p. 261-266, fev. 2011.

SILVA, K. L. O. et al. **Vacinas contra a leishmaniose:** uma revisão. São Paulo: Arch Health Invest, 2013.

SILVA, J. A. et al. Leishmaniose Visceral e gestação em transplantada renal: Relato de Caso. **J Bras Nefrol.**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 268-270, jun. 2015.

SILVA, J. C. et al. Comparison of optical microscopy and quantitative polymerase chain reaction for estimating parasitaemia in patients with kala-azar and modelling infectiousness to the vector Lutzomyia longipalpis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 8, p. 517-522, ago. 2016.

SILVA, M. A. L. da et al. Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral humana. **Rev Eletronica Farm.**, Goiânia, v. 7, n. 3, p. 1-15, jul. 2010.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M. Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J Clin Microbiol.**, Washington, v. 39, n. 2, p.560-563, fev. 2001.

SOUZA, L.W.; SOUZA, S.V.; BOTELHO, A.C. Comparative analysis of the geographic distribution of the histopathological spectrum and Leishmania species of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. **An Bras Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 3, p. 369-374, jun. 2012.

SRIVIDYA, G. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: Developments over the last decade. **Parasitol Res.**, Berlin, v. 110, n. 3, p. 1065-1078, mar. 2012.

\_\_\_\_\_; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clin Diag Lab Immunol.**, Washington, v. 9, n. 5, p. 951-958, set. 2002.

\_\_\_\_\_. et al. Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex agglutination test. **Am J Trop Med Hyg.**, Northbrook, v. 73, n. 2, p. 269-271, ago. 2005.

SUNDARSHAN, M.; SUNDAR, S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, New York, v. 80, n. 1, p. 40-42, set. 2014.

SUNDSFJORD, A. et al. Genetics methods for detection of antimicrobial resistance. **APMIS.**, Blegdamsvej, v. 112, n. (11-12), p. 815-837, nov./dez. 2004.

TALMI-FRANK, D., et al. Kinetics and Diagnostic and Prognostic Potential of Quantitative Western Blot Analysis and Antigen-Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Experimental Canine Leishmaniasis. **Clin Vacc Immunol.**, v. 13, n. 2, p. 271–276, 2006.

VITALE, F. et al. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. **Ann N Y Acad Sci.**, New York, v. 1026, p. 139-43, out. 2004.

WERNECK, G. L. et al. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Infection.**, Heidelberg, v.31, n. 3, p.174-177, jun. 2003.

WINTER-FLOETER, L. M. **Descrição e utilização de alvos moleculares para identificação de *Leishmania* por PCR.** Bepa, São Paulo, v. 7, n. 73, p. 21-27, jul. 2010.

XAVIER, E. M. **Avaliação de uma nova abordagem diagnóstica baseada em um nanocompósito para a Leishmaniose Visceral.** 2014. 83f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

XU, M. J., et al. Circulating Tumor Cells, DNA, and mRNA: Potential for Clinical Utility in Patients With Melanoma. **Oncologist.**, v. 21, p.84-94, 2016.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. **The Lancet.**, London, v. 4, n. 6, p. 337-348, jun. 2004.

## **CAPÍTULO I**

**ARTIGO 1 – Avanços no diagnóstico laboratorial do Calazar**

**Artigo submetido à revista BiomedMed Research International**

## Avanços no diagnóstico laboratorial do Calazar

Eliamara Barroso Sabino, Vladimir Costa Silva, Carlos Henrique Nery Costa  
Universidade Federal do Piauí (UFPI). Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).  
Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela.

Endereço para correspondência: eliamarabs@hotmail.com

### Resumo

A Leishmaniose Visceral (LV), ou calazar, é uma doença aguda ou subaguda grave causada por espécies *Leishmania donovani* e *L. infantum*. O diagnóstico laboratorial se baseia em técnicas sorológicas e parasitológicas, contudo com baixa sensibilidade e especificidade. Análises moleculares como a PCR convencional e quantitativa, mostraram alta sensibilidade, porém especificidade comprometida no rastreamento de genes presentes no DNA. A quantificação de RNA para diagnóstico de LV é um campo emergente que emprega o rastreamento de genes, utilizados como biomarcadores no diagnóstico, prognóstico e estudo da terapêutica da infecção por *Leishmania sp.* As técnicas moleculares apresentam uma área promissora para diagnóstico e determinação da parasitemia e infectividade em casos assintomáticos e em pacientes imunossuprimidos com calazar.

**Palavras-chave:** Calazar. Diagnóstico molecular. qPCR.

### 1 Introdução

A LV é uma doença grave, em franca expansão territorial, causada pelas espécies *Leishmania donovani* e *L. infantum*, e transmitida pela picada de flebotomos infectados. Cães domésticos são considerados o principal reservatório e um fator de risco para a infecção visceral humana antropática (COSTA, 2011; ALVAR et al., 2012; ADAMS et al., 2014). Entre todas as doenças parasitárias, a leishmaniose é a terceira causa mais comum de mortalidade após a malária e a esquistossomose (READY, 2014).

O diagnóstico do calazar é baseado nos sinais e sintomas, pode ser inconclusivo e confundido com outras doenças coendêmicas (SRIVIDYA et al., 2012; MANSUETO et al., 2014). Os métodos disponíveis para o diagnóstico laboratorial de LV envolvem várias técnicas, como a demonstração do parasita em tecidos, cultura in vitro, técnicas sorológicas e moleculares (SAVOIA, 2015).



Não existe uma técnica laboratorial capaz de mensurar, de forma fiel, a quantidade de parasitas viáveis e determinar a infectividade. O xenodiagnóstico ainda é considerado o teste de escolha para se determinar a infectividade, entretanto não se mostra eficaz em pacientes assintomáticos ou com baixa parasitemia (MILLER et al., 2014; FERREIRA et al., 2017). Testes sorológicos apresentam limitações, pois carecem de acurácia em indivíduos imunossuprimidos ou co-infectados pelo HIV (COTA et al., 2013).

As complicações em pacientes com calazar, como a leishmaniose dérmica pós calazar (Post kala-azar dermal leishmaniasis - PKDL), é caracterizada por uma erupção cutânea e ausência de parasitemia sistêmica, o que torna o diagnóstico complicado (ZIJLSTRA, 2016). Nesse sentido, o diagnóstico molecular pode ser uma importante ferramenta para as dificuldades diagnósticas tradicionais, demonstrando a presença de material genético de parasitas e identificar possíveis reservatórios (VAN DER MEIDE et al., 2008). O rastreamento de genes e novos alvos moleculares são fundamentais para o diagnóstico humano, podendo trazer melhorias no tratamento e prognóstico de pacientes infectados.

## **2 Condições para Diagnóstico**

A visualização direta do parasita em microscopia óptica é considerada o padrão ouro no diagnóstico de LV. O exame parasitológico consiste primeiro na investigação microscópica das formas amastigotas em material, posteriormente no isolamento em cultura *in vitro* para confirmar o agente etiológico e posterior identificação das espécies de *Leishmania* sp. envolvidas (SAVOIA, 2015).

Microscopia tem alta especificidade, e as formas amastigotas podem ser observadas nos tecidos do fígado, medula óssea, gânglios linfáticos e baço. Entretanto, esse método pode sofrer influência do tecido ou amostra biológica coletada do analista e do tempo que se dedica à busca ativa em lâmina. A sensibilidade na detecção de formas amastigotas em esfregaços de medula óssea têm sensibilidade de 70% (CHOUHI et al., 2008), mas pode ultrapassar 95% quando o material é examinado por técnico experiente durante 60 minutos (SILVA; GONTIJO; MELHO, 2005).

O exame microscópico do aspirado esplênico tem alta sensibilidade, de 95% a 98%, mas requer procedimentos invasivos com complicações potencialmente graves, mesmo com as técnicas consideradas mais seguras (SEBLOVA, 2013). Uma alternativa é a biópsia hepática, com sensibilidade variando de 53% a 86%, podendo ser maior em pacientes co-infectados com HIV (SILVA; GONTIJO; MELHO, 2005). A aspiração linfonodal para

exame microscópico direto tem sensibilidade variando de 52% a 58%. A menor sensibilidade é observada em esfregaços de sangue periférico, uma vez que a parasitemia em indivíduos imunocompetentes é baixa (RABELLO; DISCH, 2003).

A biopsia em tecidos também vem demonstrando poder diagnóstico. A LV pode promover ulcerações, sangramentos e perfurações no sistema digestivo, por isso a biopsia intestinal tem grande valia para estudo da resposta imune devido ao infiltrado linfocitário, assemelhando-se a outros órgãos como o fígado e o baço. A presença de parasitas no duodeno é um evento comum nos portadores do calazar e em pacientes co-infectados pelo HIV se torna ainda mais frequente (ELMAHALLAWY et al., 2014).

A cultura de tecidos tem um importante papel no diagnóstico, utilizando a medula óssea tem sensibilidade de aproximadamente 70% e a cultura do creme leucocitário do sangue periférico alcança sensibilidade de 60%, aproxima-se a 70% em pacientes co-infectados pelo HIV e pode ser útil em situações em que o aspirado de medula óssea não possa ser viabilizado (CHOUHI et al., 2008).

A cultura de leishmania em aspirados esplênicos ou aspirados de medula óssea tem alta especificidade, embora seja tediosa, demorada, requer experiência, equipamento caro e, portanto, restrita a centros de pesquisa de referência e hospitais (READY, 2014). A sensibilidade diagnóstica pode ser melhorada com desenvolvimento do método de microcultivo para o isolamento do parasita (ELMAHALLAWY et al., 2014). Além da variabilidade em sua sensibilidade, os testes parasitológicos são invasivos, tornando-se difíceis de executar em condições de campo. Dessa forma, os testes sorológicos são a escolha para o diagnóstico de LV, apresentando boa sensibilidade. O teste de imunofluorescência é recomendado pelo Ministério da Saúde no Brasil e tem uma sensibilidade variando de 50% a 95% (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b).

Destarte, a pesquisa de antígenos em outros fluidos biológicos vem demonstrando poder no diagnóstico da LVH. Singh et al. (2009) e Mohapatra et al. (2014) relatam, em seus estudos, que vários fluidos biológicos podem ser utilizados para o diagnóstico, e que o uso de expectoração e urina de pacientes infectados mostram bons resultados. Pesquisas demonstraram que a investigação de anticorpos anti-rK39, utilizando saliva de pacientes imunocompetentes, apresentou sensibilidade de 58,6% (DA SILVA et al., 2015). Entretanto, a titulação de anticorpos pode influenciar no diagnóstico, o que sugere que a saliva não é um bom meio para diagnóstico de LV. O rastreio de rK39 utilizando urina demonstrou ser adequado para a identificação da LV, para o acompanhamento do tratamento, e para a detecção de infecção subclínica (RIERA et al., 2004; SAVOIA, 2015). Contudo, Lemos

(2014) relata que para um bom diagnóstico deve-se coletar grande volume de urina, para evitar falsos negativos. Relata, ainda, que a qualidade do diagnóstico é dependente do perfil imunológico do paciente, demonstrando que preferencialmente em pessoas com sistemas imunológicos comprometidos os resultados não são confiáveis.

### **3 Tecnologias de diagnóstico disponíveis**

Existem vários métodos para o diagnóstico sorológico da LV devido à alta produção de anticorpos e hipergamaglobulinemia. Dentre os testes, destacam-se: Teste de Aglutinação Direta (TAD); Teste Indireto de Anticorpos Fluorescentes (TIAF); Teste de Hemaglutinação Indireta (THI); Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Testes Imunocromatográficos (ICTs). Os testes sorológicos são mais comumente usados para o diagnóstico de LV e são sensíveis, mas a especificidade pode variar (SAVOIA, 2015; CHAPPUIS et al., 2007; RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2006).

Dentre os ensaios enzimáticos, o ELISA é o método mais utilizado, uma vez que é capaz de processar várias amostras ao mesmo tempo e apresenta alta sensibilidade. Faz uso de vários antígenos, como gp63, gp70, gp72 e rK39, o que pode afetar sua sensibilidade e especificidade. No entanto, existe a possibilidade de reatividade cruzada com antígenos semelhantes pertencentes a outras doenças (XAVIER, 2014). O rK39 tem sensibilidade e especificidade excepcionais, mas é ineficaz em certas regiões do mundo, como na África, onde os indivíduos infectados possuem anticorpos rK39 baixos (FONSECA, 2013; LEMOS, 2014). Os testes sorológicos, como o ELISA e o RIFI (Imunofluorescência Indireta), não são totalmente utilizados no campo devido à falta de adaptação, porém o Teste de Aglutinação Direta (TAD) é de fácil manuseio e utilização (LEMOS, 2014).

O TAD é simples e de baixo custo, apresenta sensibilidade e especificidade entre 70% e 100% (PEDRAS et al., 2008), e tem se mostrado útil como primeiro instrumento diagnóstico em área endêmica. Uma alternativa são os testes imunocromatográficos, que apresentam sensibilidade acima de 98%, são de fácil execução e interpretação, não necessitam infraestrutura laboratorial, não exigem laboratoristas especializados, e são hoje promissores para o diagnóstico rápido em áreas endêmicas (BERN et al., 2007). Um estudo multicêntrico com um teste comercial para detecção de anticorpo contra o antígeno rK39 da *L.chagasi* realizado no Brasil mostrou sensibilidade de 93% e especificidade de 97%, abrindo perspectiva para o diagnóstico rápido, de fácil realização e interpretação.

A avaliação de um teste de aglutinação de látex (KAtex) detecta um glicoconjugado de baixo peso molecular (5-20 kD), um antígeno de carboidrato estável ao calor, na urina de pacientes com LV, esse pode ser detectável até seis meses após o tratamento. O método é apropriado para o diagnóstico de LV primária, para monitorar a eficácia do tratamento e para a detecção de infecção subclínica (CRUZ et al., 2006). Conforme Sundar e Chakravarty (2015), a KAtex tem valor preditivo positivo, alta especificidade de 82% a 100% e sensibilidade variável de 47% a 95%.

Os anticorpos antileishmania permanecem detectáveis durante meses ou anos após o tratamento do doente, entretanto, a recaída da infecção é difícil de diagnosticar. Além disso, comparações de vários testes sorológicos, geralmente, demonstram baixos níveis de concordância com os resultados obtidos em indivíduos assintomáticos em regiões endêmicas (SILVA et al., 2011). Ademais, em áreas endêmicas, indivíduos saudáveis podem ser positivos nesses testes de detecção por causa de infecção assintomática ou eliminação incompleta do parasita em infecções passadas (GIDWANI et al., 2011). Foi demonstrado que na co-infecção pelo HIV, os métodos sorológicos apresentam baixa sensibilidade, uma vez que a determinação de anticorpos é difícil devido à ação imunossupressora do vírus (SAVOIA, 2015).

#### **4 Estratégias moleculares e novas perspectivas diagnósticas**

A técnica molecular mais utilizada é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que utiliza vários materiais clínicos, tais como medula óssea, soro, urina, sangue total, pele, linfonodo, entre outros, para identificação por meio de alvos moleculares (FONSECA, 2013).

A PCR tem sido utilizada quando a microscopia e a sorologia são ineficazes, incluindo a monitorização pós-tratamento. A detecção de DNA do parasita no sangue, medula óssea ou espécimes de biópsia é promissora (RABELLO; DISCH, 2003; DA SILVA et al., 2015). A PCR convencional é ineficaz para diferenciar entre LV clinicamente ativa de infecções assintomáticas. Essa desvantagem, no entanto, pode ser superada pela PCR quantitativa (SUNDAR et al., 2005).

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR), tem sido demonstrada como importante ferramenta de diagnóstico, quantificando parasitas e demonstrando a expressão de genes (MOTAZEDIAN et al., 2008; PAIVA-CAVALCANTI et al., , 2015), sendo eficaz na monitorização do doente, pois quantifica instantaneamente a carga parasitária, demonstrando o número de parasitas presentes em volume determinado de amostra (PITA-PEREIRA et al.,

2012; PADMANABHAN et al., 2012). Apresenta sensibilidade superior à pesquisa direta e tem sensibilidade comparável à pesquisa de amastigotas em aspirado esplênico. Pode, ainda, monitorar a carga parasitária em pacientes assintomáticos durante o tratamento e na identificação de recorrências (SUNDAR et al., 2005; BOURGEOIS et al., 2008; SILVA et al., 2011; PEREIRA et al., 2014).

Domínios conservados de mini círculos têm sido utilizados como alvo para amplificação de DNA de *Leishmania sp.* (FERRERIA et al., 2007; ALVARENGA et al., 2012). A qPCR, utilizando primers de DNA de cinetoplasto, em amostras de sangue, apresenta sensibilidade de 100% (WINTER-FLOETER, 2010; SUNDARSHAN; SUNDAR, 2014). Uma série de sequências alvo tem sido rastreada para diagnóstico de LV, incluindo o cinetoplasto, RNAr, 18SRNA, genes de RNA derivados do mini exon, região de gene de alfa tubulina, locus de gp63, regiões intercalares internas de transcrição, e HSP70 (SRIVIDYA et al., 2012).

A sensibilidade da qPCR em indivíduos imunocompetentes, para amostras de sangue e medula óssea, é semelhante. Na última década, a demonstração de DNA do parasita em amostras de urina de pacientes imunocompetentes identificou alta sensibilidade (96,6%) e especificidade (100%). Recentemente a qPCR em outros fluidos demonstrou sensibilidade de 94,6%, com uma especificidade de 90%. Entretanto seu valor como ferramenta para monitorar pacientes coinfectados pelo HIV necessita ser comprovado (SUNDAR et al., 2005; CECCARELI et al., 2014).

Em pacientes infectados pelo HIV foi demonstrado que a alta carga parasitária inicial, quantificada por qPCR, predispõe o enfermo a um maior risco de reincidência clínica (MOLINA et al., 2013). Pereira et al. (2014) demonstram que a qPCR em pacientes imunossuprimidos tem conformidade com a PCR convencional, apresentando sensibilidade de 100%. Ajustes críticos nas condições intralaboratoriais são essenciais para garantir a eficiência e sensibilidade.

A determinação de infectividade em pacientes com calazar é por meio do xenodiagnóstico, entretanto estudos de Ferreira et al. (2017), demonstraram baixa correlação do xenodiagnóstico e os níveis de DNA em pacientes co-infectados pelo HIV. A presença de “DNAemia” pode superestimar a quantificação de parasitas, não demonstrando a presença de parasitas viáveis circulantes em sangue periférico quando comparado à microscopia (CHEMLI et al., 2006; SALAM et al., 2012; SILVA et al., 2016). Neste contexto, estudos de quantificação de RNA poderiam determinar a presença de parasitas viáveis e a infectividade em áreas endêmicas.

Nesse panorama, a dosagem de RNA no plasma/soro é um campo emergente para aplicações de diagnóstico não invasivo. Os achados de RNA abriram um novo campo para o estudo da expressão gênica não invasiva (MARQUES et al., 2012). Assim, novos alvos terapêuticos são investigados, como mRNA de *ccl2* (HURRELL et al., 2015) e miRNA (TIWARI et al., 2017), podendo esses serem usados como biomarcadores no diagnóstico, prognóstico e terapêutica da infecção por *Leishmania sp.*

Uma abordagem promissora do qPCR é a quantificação dos níveis de transcritos de RNA (RT-qPCR), considerada uma das técnicas mais sensíveis, específicas e rápidas no diagnóstico molecular no rastreamento de genes expressos em pacientes com LV, envolvendo transcrição reversa e análise do produto PCR em tempo real (SUNDAR et al., 2005; LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011; WINTER-FLOETER, 2010). A RT-qPCR pode ser utilizada como método de diagnóstico, rastreando sequências conservadas dentro do gene cinetoplasto ou RNAr de leishmania, especialmente na co-infecção por HIV, cuja carga parasitária pode ocasionalmente ser baixa (VAN DER MEIDE et al., 2008; PACE, 2014).

Apesar de toda a tecnologia envolvida, o RT-qPCR apresenta limitações devido às variações de reagentes utilizados, bem como aos termocicladores, mas principalmente existem limitações em relação aos operadores profissionais, concentração e estabilidade do RNA em amostras biológicas (LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011).

Ensaio moleculares inovadores, tais como o ensaio baseado em sequência de ácido ribonucleico (NASBA) e a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) são utilizadas para detecção de RNA de *Leishmania sp.* A NASBA é uma ferramenta poderosa, baseada na detecção de RNA de leishmania, que combina alta sensibilidade e especificidade e pode ser aplicada ao sangue e diferenciar outros espécimes de *Leishmania sp.* (BASIYE et al., 2010; MUGASA et al., 2010). O NASBA quantitativo (QT-NASBA) é uma variação do método que alveja o RNAr 18S, homólogo para todas as espécies de leishmania, aumentando seu valor diagnóstico. Além disso, o método NASBA demonstrou maior eficácia do que a PCR convencional no Sudão, onde a parasitemia é baixa. Tais técnicas são importantes para o diagnóstico das espécies e para identificar polimorfismos para genotipagem de várias espécies de leishmania (VERMA et al., 2013).

## **5 Considerações Finais**

Os casos de calazar, atualmente, têm uma maior distribuição em áreas urbanas, o que aponta a importância do diagnóstico precoce no combate dessa patologia. As limitações

diagnósticas devem ser superadas e ações governamentais são fundamentais para o desenvolvimento científico, tecnológico e para inovação em saúde. Técnicas moleculares como RT-qPCR, QT-NASBA e LAMP apresentam maior sensibilidade, podendo determinar infecção ativa e presença de parasitas viáveis, comprovando seu papel na quantificação e determinação do perfil de infecciosidade em áreas urbanas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E. R., et al. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. **Parasitol.**, v. 141, n. 14, p. 1891–1897, 2014.

ASSIS, T. S. M. D., et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral humana. **Ep S Saúde.**, v.17, n.2, p.107-116, 2008.

ALVAR, J.; IVAR I.; VÉLEZ, D.; BERN, C.; HERRENO, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE.**, v. 7, n. 5, 2012.

ALVARENGA, J. S., et al. kDNA genetic signatures obtained by LSSP-PCR analysis of *Leishmania (Leishmania) infantum* isolated from the new and the old world. **PLoS One.**, v.7, e43363, 2012.

BARBOSA, I.R. **Epidemiologia da Leishmaniose Visceral no estado do Rio Grande do Norte, Brasil.** Natal: Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção, 2013.

BASIYE, F., et al. Sensitivity and specificity of the *Leishmania* Oligo C-Test and NASBA-oligochromatography for diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya. **Trop Med Int Health.**, v. 15, n. 7, p. 806–10, 2010.

BERN, C., et al. The epidemiology of visceral leishmaniasis and asymptomatic leishmanial infection in a highly endemic Bangladeshi village. **A J Trop Med Hygiene.**, v.76, n.5, p.909-14, 2007.

BOURGEOIS, N., et al. Long-Term Monitoring of Visceral Leishmaniasis in Patients with AIDS: Relapse Risk Factors, Value of Polymerase Chain Reaction, and Potential Impact on Secondary Prophylaxis. **J A Im Def Syndrome.**, v. 48, p.13-19, 2008.

BRASIL. **Leishmaniose Visceral: Recomendações Clínicas para Redução da Letalidade** In: SdVe Saúde., Ed. Ministério da Saúde do Brasil, p. 77, 2011a.

BRASIL. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeccao Leishmania-HIV** In: SdVe Saúde, Ed. Ministério da Saúde do Brasil, p. 106, 2011b.

CECCARELLI, M., et al. Detection and Characterization of *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* by SYBR Green- Based Real-Time PCR and High Resolution Melt Analysis Targeting Kinetoplast Minicircle DNA. **Plos One.**, v. 9, n. 2, 2014.



CHAPPUIS, F., et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbol.**, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

CHEMLI, J., et al. Apport de la leucoconcentration dans le diagnostic du kala-azar en Tunisie. **Med Mal Infectieuses.**, v. 36, n. 7, p. 390-392, 2006.

CHOUIHI, E., et al. Cultures on NNN medium for the diagnosis of leishmaniasis. **Path Biol.**, 2008.

COTA, G.F., et al. Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study. **A J Trop Med Hygiene.**, v. 89, n. 3, p. 570-577, 2013.

COSTA, C.H.N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 44, n. 2, p. 232-242, 2011.

CRUZ, I., et al. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. **J Clin Microbol.**, v. 44, n. 7, p. 2343–237, 2006.

DA SILVA, M.R., et al. Evaluation of an rK39-based immunochromatographic test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in human saliva". **Trop Biomed.**, v. 32, n. 2, p. 247-56, 2015.

ELMAHALLAWY, E., et al. Diagnosis of leishmaniasis. **J Infec Dev Countr.**, v. 8, n. 8, p. 961–972, 2014.

FERREIRA, G.R., et al. Human Competence to Transmit *Leishmania infantum* to *Lutzomyia longipalpis* and the Influence of Human Immunodeficiency Virus Infection. **A J Trop Med Hygiene.**, v. 98, n. 1, p.126-133, 2017.

FERREIRA, G. A., et al. Discrimination of *Leishmania braziliensis* variants by kDNA signatures produced by LSSP-PCR. **J Parasitol.**, v. 93, p.712-714, 2007.

FONSECA, A. M. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral utilizando proteínas de leishmania infantum com função desconhecida**, 74f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, 2013.

GIDWANI, K., et al. Persistence of *Leishmania donovani* antibodies in past visceral leishmaniasis cases in India. **Clin Vac Immunol.**, v. 18, n. 2, p.346–348, 2011.

HURRELL, B. P., et al. Rapid Sequestration of *Leishmania mexicana* by Neutrophils Contributes to the Development of Chronic Lesion. **PLOS Pathogens**, v. 28, 2015.

LADEIRA, P. R. S.; ISAAC, C.; FERREIRA, M. C. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real/ Real-time reverse transcription polymerase chain reaction. **Rev Med.**, v. 90, n. 1, p.47-51, 2011.

LEMOS, L.C.D. **Expressão heterológica da rKDDR de leishmania infantum: um novo antígeno recombinante para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral. 100f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia).** Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, 2014.

MANSUETO, P., et al. Leishmaniasis in travelers: A literature review. *Trav Med Infect Dis.*, v. 12, n. 6, p.563–581, 2014.

MARQUES, L. H. S., et al. Low Parasite Load Estimated by qPCR in a Cohort of Children Living in Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLOS Negl Trop Dis.**, v. 6, n. 12, e1955, 2012.

MILLER, E., et al. Quantifying the contribution of hosts with different parasite concentrations to the transmission of visceral leishmaniasis in Ethiopia. **PLOS Negl Trop Dis.**, v.8, e3288, 2014.

MOHAPATRA, S.; SAMANTARAY, J. C.; GHOSH, A. A. Comparative Study of Serum, Urine and Saliva Using rk39 Strip for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **J Art Dis.**, 2014.

MOLINA, I., et al. Ultrasensitive Real-Time PCR for the Clinical Management of Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected Patients. **Am J Trop Med Hygiene.**, v. 89, n. 1, p. 105–110, 2013.

MOTAZEDIAN, M. et al. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. **Diag Microbiol Infect Dis.**, v. 60, n. 2, p. 151-154, 2008.

MUGASA, C., et al. Simplified molecular detection of *Leishmania* parasites in various clinical samples from patients with leishmaniasis. **Parasitol Vec.**, v. 3, p. 13, 2010.

PACE, D. Leishmaniasis. **Braz J Infect Dis.**, v. 69, p. 10–8, 2014.

PADMANABHAN, P. K., et al. Novel Features of a PIWI-Like Protein Homolog in the Parasitic Protozoan *Leishmania*. **PLoS ONE**, 2012.

PAIVA-CAVALCANTI, M., et al. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. **Cell Biosc.**, v. 5, pp. 31, 2015.

PEDRAS, M.J., et al. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hygiene.**, v.102, n.2, p.172-8, 2008.

PEREIRA, M. R., et al. Comparison between conventional and real-time PCR assays for diagnosis of visceral leishmaniasis. Hindawi Publishing Corporation. **BioMed Res Int.**, v. 2014, p. 4, 2014.

PITA-PEREIRA, D. R., et al. SYBR Green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parsit Vect.**, v. 5, n.15, 2012.

RABELLO, A.; DISCH, O.M. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, p.17-28, 2003.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clin Epidemiol.**, v. 6, p. 147–154, 2014.

RIERA, C., et al. Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. **E J Clin Microbiol Infec Dis.**, v. 23, n. 12, p. 899-904, 2004.

RODRIGUEZ-GONZALEZ, I., et al. Identification of New World *Leishmania* species from Peru by biochemical techniques and multiplex PCR assay. **FEMS**, v. 267, 2006.

SALAM, M. A., et al. Mondal, Peripheral blood buffy coat smear: a promising tool for diagnosis of visceral leishmaniasis. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 3, p. 837-840, 2012.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **J Infec Dev Coun.**, v. 9, no. 6, pp.588–596, 2015.

SEBLOVA, V. *Phlebotomus orientalis* sand flies from two geographically distant Ethiopian localities: biology, genetic analyses and susceptibility to *Leishmania donovani*. **Plos Neg Trop Dis.**, v. 7, n. 4, 2013.

- SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.; MELO, M.N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. **Trend Parasitol.**, v. 21, p. 550–552, 2005.
- SILVA, L. A., et al. Antileishmania immunological tests for asymptomatic subjects living in a visceral leishmaniasis-endemic area in Brazil. **A J Trop Med Hygiene.**, v. 84, n. 2, p. 261–266, 2011.
- SILVA, J. C., et al. Costa, Comparison of optical microscopy and quantitative polymerase chain reaction for estimating parasitaemia in patients with kala-azar and modelling infectiousness to the vector *Lutzomyia longipalpis*. **Mem Inst O Cruz**, v. 111, n. 8, p. 517–522, 2016.
- SINGH, D.; et al. Novel noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by rK39 testing of sputum samples. **J Clin Microbiol.**, v. 47, n. 8, p. 2684–2685, 2009.
- SRIVIDYA, G., et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: Developments over the last decade. **Parasitol Res.**, v. 110, p. 1065–1078, 2012.
- SUNDAR, S., et al. Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex agglutination test. **A J Trop Med Hygiene.**, v. 73, n. 2, p. 269–271, 2005.
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An Update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis. **Exp Pharmac.**, v. 16, n. 2, p. 237–252, 2015.
- SUDARSHAN, M.; SUNDAR, S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. **Diag Microbol Infec Dis.**, v. 80, n. 1, p. 40–42, 2014.
- TIWARI, N., et al. Identification and Characterization of miRNAs in Response to *Leishmania donovani* Infection: Delineation of Their Roles in Macrophage Dysfunction. **Front Microbiol.**, vol. 8, 2017.
- VAN DER MEIDE, W., et al. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites. **J Clin Microbiol.**, v. 46, n. 1, p. 73–8, 2008.
- VERMA, S., et al. Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Diag Microbol Infec Dis.**, v. 75, n. 4, p. 390–395, 2013.

XAVIER, E.M. Avaliação de uma nova abordagem diagnóstica baseada em um nanocompósito para a Leishmaniose Visceral. 83f. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

WINTER-FLOETER, L. M. **Descrição e utilização de alvos moleculares para identificação de Leishmania por PCR.** New molecular targets for PCR identification of Leishmania. Universidade de São Paulo, 2010.

ZIJLSTRA, E. Visceral leishmaniasis: a forgotten epidemic. **Arc Dis Child.**, v.101, n. 6, p.561-567, 2016.

## **CAPÍTULO II**

### **ARTIGO 2 – Quantificação de RNAm do gene *HSP70* de *Leishmania infantum* no sangue de pacientes com Leishmaniose Visceral**

**Artigo submetido à Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**

## Quantificação de RNAm do gene *HSP70* de *Leishmania infantum* no sangue de pacientes com Leishmaniose Visceral

Eliamara B. Sabino<sup>1</sup>, Vladimir C. Silva<sup>1</sup>, Gabriel R. Ferreira<sup>1</sup>, Dorcas L. Costa<sup>1</sup>, Carlos H.N. Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí, Departamento de Medicina Comunitária, Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella, Laboratório de Leishmanioses

### Resumo

A Leishmaniose Visceral (LV), ou calazar, é causada pelo protozoário das espécies *Leishmania donovani* e *L. infantum*, que provocam uma das mais mortais doenças tropicais mais letais. A presença de transcritos de RNAm vem demonstrando ser um bom biomarcador e campo promissor para a pesquisa de parasitas viáveis em amostras biológicas. Devido à labilidade e rápida degradação, a quantidade de RNA de parasitas circulantes em sangue periférico do hospedeiro pode ser uma estimativa da parasitemia e um preditor de infecciosidade. Dessa forma, objetivou-se descrever a presença de RNA de *L. infantum* através do sistema de PCR quantitativa (qPCR). As reações foram realizadas em amostras de sangue de 79 pacientes com calazar admitidos em um hospital de referência em Teresina, Brasil. Foram extraídos o RNA e DNA das amostras do creme leucocitário do sangue para posterior quantificação. Para amplificar RNAm, após a exposição à transcriptase reversa foi utilizado um par de primers para o gene HSP70, usando o sistema SYBR Green. Para o DNA foi usado um par de primers para o DNA do cinetoplasto, usando o sistema Taqman. Foram aplicados testes estatísticos não-paramétricos. A correlação entre RNA e DNA foi significativa ( $p = 0.03$ ;  $\rho 0.23$ ). A mediana da estimativa de parasitemia para o RNA foi de 32,5 parasitas/mL e para o DNA a foi de 1380 parasitas/mL. A parasitemia estimada não se mostrou associado à idade, gênero, infecção pelo HIV, gravidade do quadro clínico ou a morte. Embora promissora, esta técnica deve ser validada para estimativa da parasitemia e para eventual substituição do xenodiagnóstico para verificação da infecciosidade de reservatórios com calazar.

**Palavras-chave:** Calazar. Leishmaniose Visceral. qPCR

## 1 Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV), ou calazar, é causada pelas espécies protozoários *Leishmania donovani* e *L. infantum*. É considerada uma doença reemergente, apresentando significativo aumento de casos em seres humanos. Estima-se que 0,4 milhões de pessoas são infectadas, com até 40.000 mortes por ano (ELMAHALLAWY et al., 2014; DI MUCCIO et al., 2015; DHINGRA et al., 2010). Apesar do crescente número de pessoas infectadas em todo o mundo, muitos casos não são reportados (JERONIMO et al., 2004; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015).

Após a entrada do parasita pela pele dos hospedeiros vertebrados através da picada do flebotomíneo transmissor, inoculada junto com a saliva, as formas infectantes das duas espécies viscerotrópicas de *Leishmania* localizam-se nos linfonodos, baço, fígado, pele e revestimentos mucosos (IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007). A re-infecção de vetores ocorre por parasitas circulantes ou da pele são posteriormente transmitidos para os vetores (COSTA, 2011). Embora os cães sejam considerados os principais reservatórios em áreas urbanas por infectarem mais flebotomíneos, os seres humanos são uma importante fonte de sangue para o vetor em áreas urbanas e podem ser tão relevantes (MACEDO-SILVA, et al., 2014). Entretanto, o seu papel na transmissão da doença não está claramente definido (COSTA et al., 2000; COSTA et al., 2005; FERREIRA et al., 2017). O xenodiagnóstico (a exposição à picada de flebotomíneos não infectados) é o padrão ouro para determinar a infecciosidade mas apresenta limitações por se tratar de um teste trabalhoso, caro, que precisa de pessoal treinado, instalações adequadas para o insetário, além de sofrer restrições do comitês de ética (CHAPPUIS et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; MILLER et al., 2014).

Neste sentido, novas estratégias para demonstrar a presença de parasitas viáveis em sangue e determinar a infecciosidade vem sendo adotadas, como a utilização de técnicas moleculares (MILLER et al., 2014; SEBLOVA et al., 2013; KIRSTEIN et al., 2017). Recentemente, Ferreira et al. (2017) demonstraram que existe correlação entre o xenodiagnóstico e a quantidade de DNA de parasitas circulantes. Além disso, Silva et al. (2016) relataram que a quantificação de DNA do parasita, quando comparado com a microscopia, é superestimada, não demonstrando a presença de parasitas viáveis circulantes em sangue.

Nesta perspectiva, pesquisas com RNAm circulante no sangue vem demonstrando ser este um campo emergente para diagnóstico não invasivo, devido a sua característica lábil, sua



presença em fluidos biológicos e ao fato de representar atividade transcricional celular (MARQUES et al., 2012). Transcritos de RNA também podem ser usados como biomarcadores (PELLEGRINI et al., 2015; XU et al., 2016; IMAMURA et al., 2016). Portanto, este estudo teve por finalidade explorar a quantificação de RNAm de um gene de *L. infantum* a partir do creme leucocitário do sangue de pacientes com LV, para avaliar seu potencial no estudo da transmissão de *L. infantum* por seres humanos.

## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 População de estudo

A amostra consistiu de sangue periférico de 79 pacientes atendidos no Instituto de Doenças Tropicais “Natan Portella” (IDTNP). Foram considerados aptos para participar os pacientes com quadro clínico de febre e hepato-esplenomegalia que apresentarem diagnóstico para LV confirmado através de teste sorológico, exame direto e cultura de punção de medula óssea, e reação em cadeia da polimerase (PCR). Os dados clínicos foram coletados dos prontuários dos pacientes. Os pacientes foram incluídos após a assinatura do termo de consentimento. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal do Piauí (UFPI) (40374714.8.0000.5214).

### 2.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi obtida de 200 µL de creme leucocitário usando o mini kit Pure Link DNA (Life Technologies Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA e a pureza foram medidas com espectrofotômetro (NanoDrop™ 2000 Thermo Scientific Inc., Wilmington, DE) utilizando comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, as amostras foram ajustadas para concentração final de 10 ng/ µL para reação de qPCR.

### 2.3 Extração de RNA e montagem de cDNA

O sangue foi centrifugado (3000 rpm por 5 minutos) e separado 800 µL de creme leucocitário que foi transferido para tubo contendo 1200 µL de RNAlater (Invitrogen Carlsbad, CA, USA), a amostra foi estocada continuamente a -20 °C até a extração de RNA. Para extração de RNA foram utilizados 1000 µL da amostra preservada, usando o kit SV

Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Posteriormente foram sintetizadas as bibliotecas de cDNA utilizando o kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems, Califórnia, USA). A concentração e pureza do RNA e cDNA foram medidos em NanoDrop™ 2000 nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. O cDNA foi diluído para concentração final de 200 ng/μl para as reações de quantificação.

#### 2.4 Construção da curva padrão

Um isolado (MHOM/BR/2016/5745) de *L. infantum* (50 μL) obtido de um paciente de Teresina que foi tratado e curado, foi inoculado em 1 mL de NNN (meio Novy-McNeal-Nicolle) e meio Schneider (Schneider's Insect Medium, Sigma, St. Louis, EUA), a cultura foi incubada durante cinco dias a 27°C. No quinto dia, os parasitas foram contados em uma câmara Neubauer. Para extrair o DNA e RNA,  $5 \times 10^6$  parasitas foram centrifugados a 1200 g durante 10 minutos. Após centrifugação, o sedimento foi lavado três vezes em solução RPMI e lavado uma vez em 200 μL de solução salina estéril. Para gerar a curva padrão, as amostras de DNA foram ajustadas para o equivalente a  $2,5 \times 10^4$  parasitas / mL em água pura, seguidas de diluições seriadas ( $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ).

#### 2.5 qPCR DNA

A detecção e quantificação de *L. infantum* foi realizada através de uma série de reações de qPCR usando a tecnologia de sondas de hidrólise (Taqman®), conforme descrito por Rolão *et al.* (2004). Os oligonucleótidos e as sondas foram concebidos com base na sequência de minicírculo de DNA de cinetoplasto (kDNA) de um isolado de *L. Infantum* (MHOM/BR/2016/5745). As sequências utilizadas para a detecção foram Linf kDNA-F 5'-GGCGTTCTGCAAAATCGGAAAA-3', Linf kDNA-R 5'-CCGATTTTTGGCATTTTTGGTCGAT-3', e Linf kDNA\_FAM-5'-TTTGAACGGGATTTCTG-3' (AF Genbank número de acesso 169140). As reações foram realizadas em um volume final de 20 μL, com 4 μL de amostra de DNA (10 ng), 0,5 μL de sondas personalizadas (2,5 pmol) e iniciadores (10 pmol) (Custom TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 10 μL de 1x master mix (TaqMan® Gene Expression Assays Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 5,5 μL de água estéril ultra pura, em placas de 96 poços usando o Sistema de PCR em

Tempo Real 7500 (Biosistemas Aplicados, Foster City, CA, EUA). Após a desnaturação inicial durante 10 min a 95°C, as amostras foram submetidas a 40 ciclos de amplificação consistindo em duas etapas: 15 seg a 95°C e 1 min a 60°C. A curva padrão foi em triplicata, e foram adicionados a cada placa dois controles negativos compostos pela mistura de reação com água em vez de amostra de DNA.

## 2.6 RT-qPCR

Para a determinação relativa de parasitas viáveis no sangue periférico, os cDNAs foram amplificados usando primers senso e anti-senso (F 5'-AGAGGTGCAGTCCCTCGTGT-3) e (R 5'-CCTCCGTCTGCTTGCTCTTG-3) para a proteína HSP70 gerando um fragmento de 137 pb (Sudarshan, Sundar 2014). O qPCR foi adaptado de acordo com Ghosh *et al.* (2015) e Ribeiro-Romão (2016), para o gene acima, foram realizadas no Sistema de PCR em Tempo Real 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando SYBR Green Chemistry (Promega, Madison, WI, USA). As condições de amplificação foram 1 ciclo a 95 °C durante 3 minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos (desnaturação), 58 °C durante 30 segundos (anelamento) e 72 °C por 30s (extensão). O sinal de fluorescência foi capturado no final de cada ciclo usando o canal SYBR (excitação 490 nm de comprimento de onda e emissão de 525 nm).

## 2.7 Análise estatística

Todos os dados coletados foram importados de uma planilha Microsoft Excel 2003® e a análise estatística foi realizada usando o Stata / SE® 10.0 para Windows (College Station, Texas, EUA). Foram calculados médias e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) de variáveis não-normalmente distribuídas, bem como medianas. O teste de Spearman foi aplicado para verificar a correlação entre as estimativas da parasitemia do qPCR.

## 3 Resultados

### 3.1 População de estudo

Foram quantificados RNAm e kDNA de parasitas de 79 pacientes. Destes, 18 eram do sexo feminino (23%) e 61 do sexo masculino (77%). A idade dos pacientes variou de um a

83 anos com média de 34 anos (IC 95%: 30, 38). Oito (10,1%) tinham idade inferior ou igual a 5 anos, três (3,8%) tinham idade entre 5 e 15 anos, 39 (49,4%) tinham entre 16 e 40 anos e 29 (36,7%) tinham idade superior a 40 anos. Vinte (29%) estavam coinfectados com o vírus HIV. Apenas três (3,8%) evoluíram para óbito, todos adultos e do sexo masculino (Tabela 1). Alguns apresentavam características clínicas relacionadas a gravidade da doença, como sangramento, dispnéia, icterícia, vômitos, edema, e infecção bacteriana.

Tabela 1 - Caracterização da população estudada de pacientes calazar do Novo Mundo, em Teresina, Brasil.

Características	Número (%)
<b>Idade (Ano)</b>	
≤ 5	08 (10,12)
5 ≤ 15	03 (3,80)
15 ≤ 40	39 (49,37)
> 40	29 (36,71)
<b>Gênero</b>	
Feminino	18 (23)
Masculino	61 (77)
<b>Infecção pelo HIV</b>	
Positivo	20 (29)
Negativo	49 (61)
<b>Probabilidade de morte</b>	
< 10 %	48 (60,8)
> 10 %	11 (13,9)
<b>Total</b>	<b>79</b>

### 3.2 Construção da curva padrão

A sensibilidade da reação qPCR foi testada usando diluições seriadas do DNA e cDNA do parasita extraído de cultura (*L. infantum*). Esta sensibilidade permitiu um limite de detecção de 0.1 parasitas/ mL de sangue. A curva padrão do DNA extraído de cultura, mostrou boa eficiência (Slope: -3,352, R<sup>2</sup>: 0,999, eficiência: 98,74) (Figura 1). O RNA extraído apresentou boa eficiência (Slope: -3.387, R<sup>2</sup>: 0,999, eficiência: 97,35) (Figura 2).

Figura 1 - Curva padrão obtida para quantificação total de DNA, utilizando sonda TaqMan para kDNA.

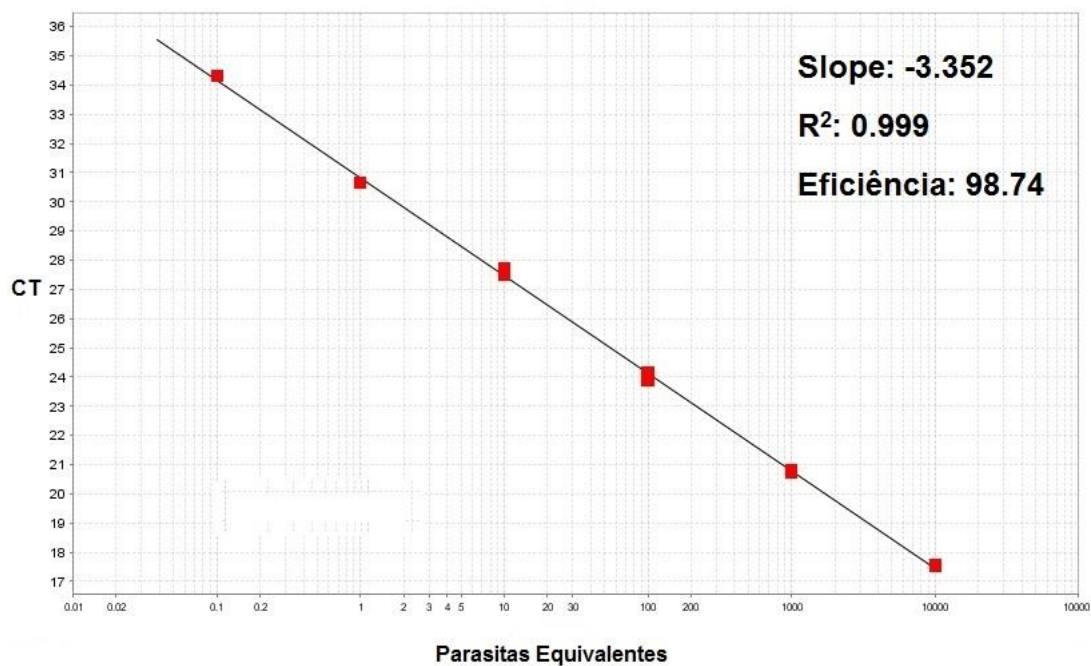
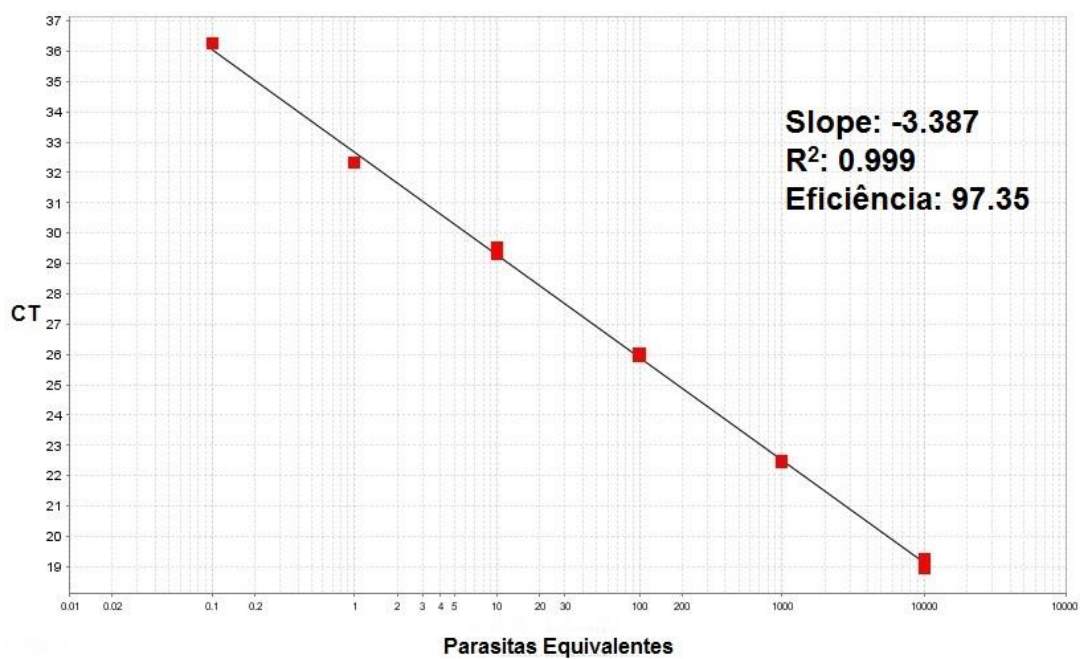


Figura 2 - Curva padrão obtida para quantificação total de cDNA, utilizando SYBR green para HSP70.



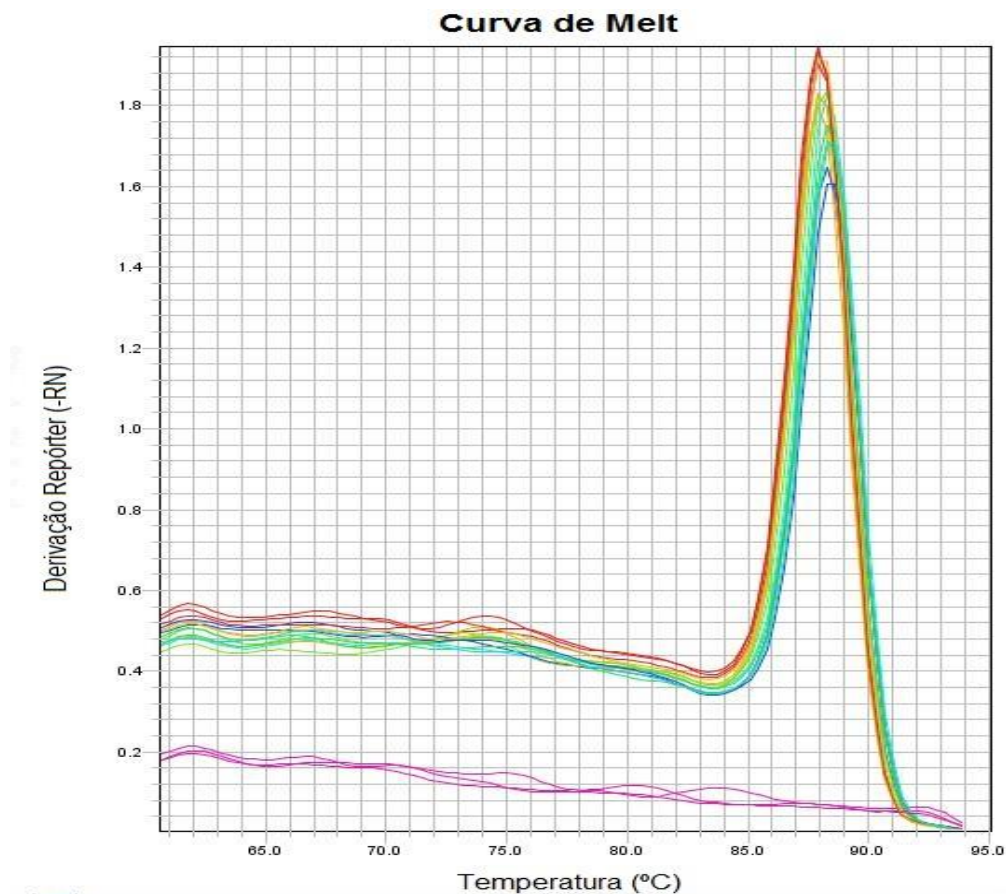
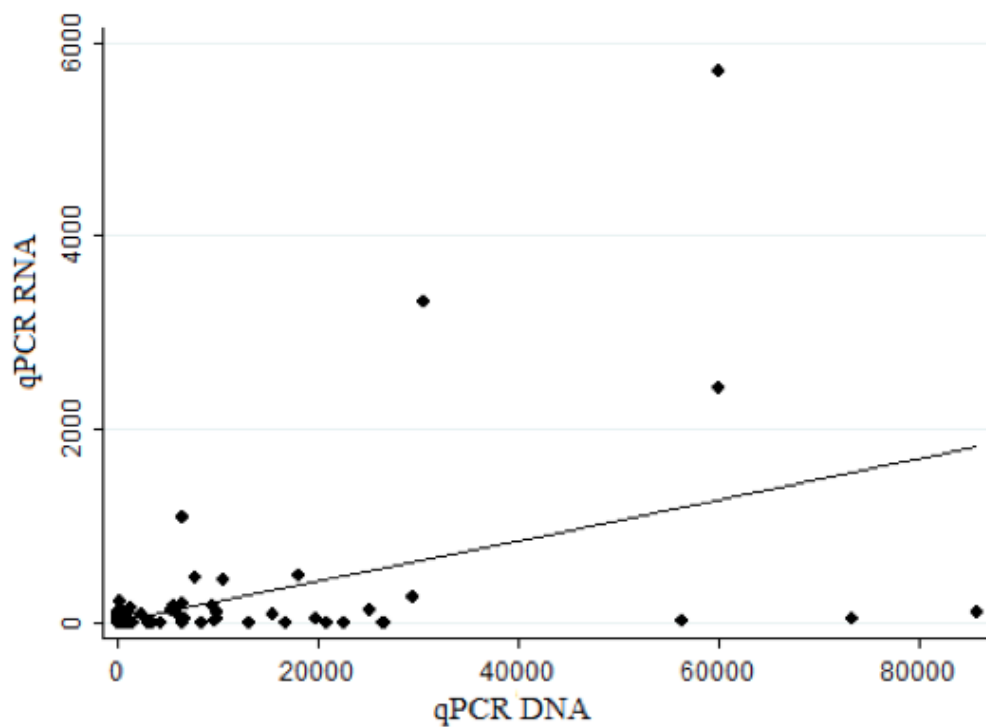


Figura 3 - Correlação entre qRT-PCR de RNA e qPCR de DNA.



### 2.3 Quantificação da parasitemia por qPCR

A mediana de parasitas para RNA foi de 32,5 parasitas/ mL, para DNA a mediana foi de 1380 parasitas / mL. Quando comparado a quantidade de parasitas, houve um aumento significativo na quantificação de DNA em comparação ao RNA com correlação positiva entre eles ( $p= 0.03$ ;  $Rho 0.23$ ) (Figura 3). Utilizando a mediana, pode-se verificar que a parasitemia de ambos não foi útil para prever a mortalidade, não houve correlação do número de parasitas / mL com infecção pelo HIV, desfecho e gravidade da doença. Para a probabilidade de morte, o grupo sem gravidade ( $\leq 10\%$ ) apresentou 130 parasitas /mL para RNA e 1.1621,4 parasitas /mL para DNA. Para o grupo grave ( $\geq 10\%$ ) o RNA apresentou 359 parasitas/ mL e 5887.7 parasitas /mL para DNA (Tabela 2). Não houve diferença significativa para a probabilidade de morte entre os grupos graves e não graves.

Tabela 2 - Quantificação de DNA e RNA de parasitas de sangue periférico de pacientes para os alvos kDNA e HSP70.

Característica	Número de pacientes	Quantificação de DNA		Quantificação de RNAm	
		Media (P/ $\mu$ L)	Mediana (P <sup>2</sup> / $\mu$ L)	Média (P/ $\mu$ L)	Mediana (P <sup>2</sup> / $\mu$ L)
Idade (Ano)					
$\leq 5$	08	3833,33	720	20,5	0
$5 \leq 15$	03	22301,67	6470	1,200 <sup>1</sup>	205
$15 \leq 40$	39	9619,34	6400	163	65
$> 40$	29	10215,6	6470	192	30
Gênero					
Feminino	18	16655,6	2357,5	198	0
Masculino	61	7543,11	1315	231 <sup>1</sup>	27,5
Infecção pelo HIV					
Positivo	20	6478,25	2237,5	254,86	72,5
Negativo	48	12383,17	2322,5	190,69	32,5
Mortalidade					
Sobreviu	76	9715,82	1360	227,33	32,5
Morreu	03	7900	10505	145	0
Probabilidade de morte					
$< 10\%$	48	11621,4	2215	130	32,5
$> 10\%$	11	5887,7	3160	359	0

<sup>1</sup> Parasitas equivalentes por mL ( $p < 0,05$ ) pela técnica Mann-Whitney .

## 4 Discussão

A maioria da população estudada era composta prioritariamente por adultos, ao contrário da população fonte (ZACARIAS et al., 2017; ALBUQUERQUE et al., 2009), por se ter evitado, na maior parte das vezes, o estudo de crianças pequenas devido ao volume de sangue necessário para o estudo. Entretanto, como não houve diferença significativa entre as medianas da estimativa de parasitemia entre os gêneros, as faixas etárias, o status de infecção pelo HIV e a gravidade da doença, é possível que a distribuição etária não tenha tido impacto na distribuição da estimativa de parasitemia na população alvo.

A identificação direta de amastigotas de *Leishmania sp.* seria o padrão ouro para o diagnóstico de infecção por estes parasitas (SILVA et al., 2005). Entretanto, o diagnóstico parasitológico pode não ter sensibilidade suficiente. Por esta razão, foram desenvolvidos sistemas de diagnóstico baseados em amplificação de ácidos nucleicos para identificação de infecção em atividade (WILSON, 1995; NICOLAS et al., 2002; IKONOMOPOULOS et al., 2003; MARY et al., 2004; VAN DER MEIDE et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2015).

A quantificação de RNA mensageiro circulante em sangue vem demonstrando ser um campo promissor de diagnóstico, uma vez que, sendo esta uma molécula com níveis elevados no meio intracelular, seu encontro significa atividade metabólica e vitalidade celular atual (SHAROVA et al., 2009; KUMARSWAMY et al., 2014; XU et al., 2016). Portanto, a quantidade de RNA mensageiro está associada a presença de células vivas (SPORNARAFIT et al., 2014; SPORNARAFIT et al., 2015). Estudos da estimativa da quantidade de amastigotas do sangue, tal como indicada por qPCR de cDNA de mRNA (VAN DER MEIDE et al., 2008), parecem indicar a quantidade de parasitas circulantes e, como tal, seriam capazes de fornecer informações valiosas sobre os fatores gerais associados a parasitemia e infectividade.

A exagerada maior quantidade estimada de parasitas através da qPCR para kDNA relativamente àquela estimada através do mRNA mostra a natureza distinta das medidas, pois enquanto a estimativa pelo DNA mede tanto os parasitas circulantes como parasitas mortos nos tecidos, a estimativa de mRNA restringe-se, possivelmente, apenas a parasitas vivos circulantes (VAN DER MEIDE et al., 2008; SHAROVA et al., 2009; PADMANABHAN et al., 2012; SILVA et al., 2016). Apesar desta substancial diferença, houve correlação positiva entre mRNA e kDNA, demonstrando que quanto maior for a carga parasitária total, maior é a quantidade de amastigotas circulantes.

Foi evidenciada a presença de 32.5 parasitas/mL, quantidade muito superior aos



achados por microscopia de Silva et al. (2016), que encontraram 0.3 parasitas/mL e a outros relatos de baixa parasitemia, também verificadas por hemoconcentração (CHEMILI et al., 2006; SALAM et al., 2012). Devido a labilidade do RNA, que no meio extracelular pode durar de minutos a horas (ROSS; KOBBS 1986), pressupõe-se que os níveis quantificados sejam superiores ao número de parasitas verificados pela microscopia, em razão de uma possível contaminação do mRNA proveniente de células recentemente mortas em tecidos, ainda que em quantidade muito inferior aquela de DNA. Mesmo assim, a quantificação de mRNA parece ser a estimativa mais fiel do número de parasitas vivos circulantes.

Esta pesquisa tem caráter inédito por se tratar da primeira demonstração de mRNA de parasitas em sangue de pacientes com calazar. O sistema baseado em qRT-PCR poderá se tornar uma técnica de referência no futuro para quantificação de parasitas viáveis. Essa estratégia deve ser validada na comparação direta com a contagem de parasitas circulantes através da microscopia. Além disso, é promissora como estimativa menos enviesada da infecciosidade do que aquela estimada através da qPCR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE P.L., et al. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceara, Brazil. **Rev Panam Salud Publica.**, v. 26, n. 4, p. 330-333, 2009.

CHAPPUIS, F., et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol.**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

CHEMLI, J., et al. Apport de la leucoconcentration dans le diagnostic du kala-azar en Tunisie. **Med Mal Infect.**, v. 36, n. 7, p. 390-392, 2006.

COSTA, C. H., et al. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **J Infect Dis.**, v. 182, p. 997–1000, 2000.

COSTA, C. H. N., et al. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol.**, v. 99, p. 229–236, 2005.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 44, n. 2, p. 232-242, 2011.

DI MUCCIO, T., et al. Correction: Epidemiology of imported Leishmaniasis in Italy: Implications for a European Endemic Country. **PLoS ONE.**, v. 10, n. 7, 2015.

DHUNGRA, K. K., et al. Morphological findings in bone marrow biopsy and aspirate smears of visceral Kala Azar: a review. **Indian J Pathol Microbiol.**, v. 53, n. 1, p. 96-100, 2010.

ELMAHALLAWY, E., et al. Diagnosis of leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries.**, v. 8, n. 8, p. 961–972, 2014.

FERRERIA, G. R., et al. Human Competence to Transmit *Leishmania infantum* to *Lutzomyia longipalpis* and the Influence of Human Immunodeficiency Virus Infection. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 98, n. 1, p. 126-133, 2018.

GHOSH, A. K., et al. Metabolic reconfiguration of the central glucose metabolism: a crucial strategy of *Leishmania donovani* for its survival during oxidative stress. **FASEB J.**, v. 29, n. 5, p. 2081-2098, 2015.

IMAMURA, T., et al. Liquid biopsy in patients with pancreatic cancer: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. **World J Gastroenterol.**, v. 22, n. 25, p. 5627-5641, 2016.

IKEDA-GARCIA, F. A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da Leishmaniose Visceral canina. **Rev Clin Vet.**, v.12, n. 71, p. 34-42, 2007.

IKONOMOPOULOS, J., et al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the propose assay on clinical samples. **Veterin Parasitol.**, v. 113, p. 99-113, 2003.

JERONIMO, S. M. B., et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **Scand J Infect Dis.**, p. 36, p. 443-449, 2004.

KIRSTEIN, O. D., et al. Minimally invasive microbiopsies: a novel sampling method for identifying asymptomatic, potentially infectious carriers of *Leishmania donovani*. **Int J Parasitol.**, v. 47, p. 609-616, 2017.

KUMARSWAMY, R., et al. Circulating Long Noncoding RNA, LIPCAR, Predicts Survival in Patients With Heart Failure. **Circ Res.**, v. 9, n. 114, p. 1569-1575, 2014.

MACEDO-SILVA, V. P., et al. Feeding preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the sand fly vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **J Med Entomol.**, v.51, p. 237–244, 2014.

MARQUES, L. H. S., et al. Low Parasite Load Estimated by qPCR in a Cohort of Children Living in Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLOS Negl Trop Dis.**, v. 6, n. 12, e1955, 2012.

MARY, C., et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. **J Clin Microbiol.**, v. 42, n. 11, p. 5249-5255, 2004.

MILLER, E., et al. Quantifying the contribution of hosts with different parasite concentrations to the transmission of visceral leishmaniasis in Ethiopia. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 8, e3288, 2014.

NICOLAS, L. E., et al. Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues. **J Clin Microbiol.**, v.40, p. 1666-1669, 2002.

PADMANABHAN, P. K., et al. Apoptosis-like programmed cell death induces antisense ribosomal RNA (rRNA) fragmentation and rRNA degradation in *Leishmania*. **Cell Death Differ.**, v. 19, p. 972–982, 2012.

PAIVA-CAVALCANTI, M., et al. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. **Cell Biosci.**, v. 5, p. 31, 2015.

PELLEGRINI, K.L.; SANDAA, M.G.; MORENO, C. S. RNA Biomarkers to Facilitate the Identification of Aggressive Prostate Cancer. **Mol Aspects Med.**, v. 45, p. 37-46, 2015.

RIBEIRO-RIMÃO, R. P., et al. Development of real-time PCR assays for evaluation of immune response and parasite load in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasit Vectors.**, v. 9, p. 361, 2016.

ROLÃO, N., et al. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. **J Parasitol.**, v. 90, n. 5, p. 1150-1154, 2004.

ROSS, J.; KOBBS, G. H4 histone messenger RNA decay in cell-free extracts initiates at or near the 3' terminus and proceeds 3' to 5'. **J Mol Biol.**, v. 188, n. 4, p. 579-593, 1986.

SALAM, M. A., et al. Peripheral blood buffy coat smear: a promising tool for diagnosis of visceral leishmaniasis. **J Clin Microbiol.**, v. 50, n. 3, p. 837-840, 2012.

SEBLOVA, V., et al. *Phlebotomus orientalis* sand flies from two geographically distant Ethiopian localities: biology, genetic analyses and susceptibility to *Leishmania donovani*. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 7, p.1-8, 2013.

SILVA, J. C., et al. Comparison of optical microscopy and quantitative polymerase chain reaction for estimating parasitaemia in patients with kala-azar and modelling infectiousness to the vector *Lutzomyia longipalpis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 111, n. 8, p. 517-522, 2016.

SILVA, M. R. B.; STEWART, J. M.; COSTA, C. H. N. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 72, n. 6, p. 811-814, 2005.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; AARBOIX, M. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J Clin Microbiol.**, v. 39, p. 560-563, 2015.

SHAROVA, L. V., et al. Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. **DNA Res.**, v.16, n. 1, p. 45-58, 2009.

SPORNRAFT, M., et al. Optimization of extraction of circulating RNAs from plasma enabling small RNA sequencing. **PLoS One.**, v. 17, n. 9, e107259, 2014.

SPORNRAFT, M., et al. The potential of circulating extracellular small RNAs (smexRNA) in veterinary diagnostics—Identifying biomarker signatures by multivariate data analysis. **Biomol Detect Quantif.**, v. 5, p.15–22, 2015.

SUNDARSHAN, M.; SUNDAR, S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 80, n. 1, p. 40-42, 2014.

VAN DER MEIDE, W., et al. Comparison between Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, Real-Time Reverse Transcriptase PCR, and Real-Time PCR for Quantification of Leishmania Parasites. **J Clin Microbiol.**, p. 73-78, 2008.

WILSON, S. M. DNA-based methods in the detection of Leishmania parasites: Fields applications and practicalities. **Ann Soc Belg Med Trop.**, v. 89, n. 1, p. 95-100, 1995.

XU, M. J., et al. Circulating Tumor Cells, DNA, and mRNA: Potential for Clinical Utility in Patients With Melanoma. **The Oncologist.**, v. 21, p.84-94, 2016.

ZACARIAS, D. A., et al. Causes and consequences of higher Leishmania infantum burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients. **Trop Med Int Health.**, v. 22, n. 6, p. 679-687, 2017.

### **CAPÍTULO III**

**ARTIGO 3 – Validação de PCR em tempo real baseado nos sistemas SYBR Green e TaqMan utilizando sangue de pacientes com calazar em região endêmica**

## Validação de PCR em tempo real baseado nos sistemas SYBR Green e TaqMan utilizando sangue de pacientes com calazar em região endêmica

Eliamara B. Sabino<sup>1</sup>, Gabriel R. Ferreira<sup>1</sup>, Vladimir C. Silva<sup>1</sup>, Dorcas L. Costa<sup>1</sup>, Carlos H.N. Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí, Departamento de Medicina Comunitária, Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella. Laboratório de Leishmanioses (LabLeish).

### Resumo

Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença crônica causada por *Leishmania infantum* e *L. donovani*. O diagnóstico precoce é importante para evitar danos severos que podem levar o paciente à morte. Dentre os métodos de diagnóstico, as técnicas moleculares apresentam elevada sensibilidade e especificidade. A presença do DNA e RNA em sangue periférico representa a quantidade de parasitas de *Leishmania infantum* circulantes e é considerada uma estimativa de sua carga total de parasitas. Objetivou-se desenvolver, avaliar e comparar um sistema baseado em qPCR para o diagnóstico por *Leishmania infantum*. A reação em cadeia da polimerase quantitativa foi realizada em amostras de sangue de 79 pacientes com calazar admitidos em um hospital de referência em Teresina, Brasil. Foram extraídos DNA e RNA das amostras dos pacientes para posterior quantificação. Os primers foram usados para amplificar kDNA, usando o sistema TaqMan, e HSP70 para SYBR Green. Foram aplicados testes estatísticos não-paramétricos. A reação para RNA e DNA apresentaram boa eficiência, respectivamente, com Slope: -3.387, R<sup>2</sup>: 0.999, Eficiência: 97.35, Slope: -3.352, R<sup>2</sup>: 0.999, Eficiência: 98.74. Por ensaio sorológico, 61/78 pacientes com calazar foram positivos, apresentando uma sensibilidade de 78% (95% IC: 67; 87) e especificidade de 86% (95% IC: 59; 98). Para os métodos moleculares, para quantificação do DNA por qPCR apresentou 74/79 pacientes positivos com sensibilidade de 94% (95% IC: 86; 98) e especificidade de 100%. Para qRT-PCR utilizando o sistema SYBR Green, 41/79 pacientes foram positivos com sensibilidade de 64% (95% IC: 52; 75) e especificidade de 82% (95% IC: 66; 92). Para qRT-PCR utilizando o sistema Taqman, todos os pacientes foram positivos com sensibilidade de 100% e especificidade de 95% (95% IC: 83; 99). Esta técnica pode ser útil para demonstrar a presença de parasitas, melhorar a sensibilidade diagnóstica, e proporcionar tratamento precoce de pacientes com calazar.

**Palavras-chave:** Calazar. Diagnóstico Molecular. qPCR.

## 1 Introdução

A Leishmaniose Visceral Humana (LVH) é tipicamente causada pelo complexo de *L. donovani*, que compreende as espécies: *Leishmania donovani* e *L. infantum* (CHAPPUIS et al., 2007) e é usualmente letal quando não diagnosticada e tratada (ELMAHALLAWY et al., 2014; DI MUCCIO et al., 2015; DHINGRA et al., 2010; READY, 2014). A principal forma de transmissão do parasita para o homem e mamíferos é pela picada do vetor da espécie *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007).

A LVH em pacientes especialmente de áreas endêmicas conhecidas, geralmente é diagnosticada clinicamente (SRIVIDYA et al., 2012). De uma maneira geral, o diagnóstico da LV vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública, principalmente devido à inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível (SOLANO-GALLEGO et al., 2001). Os métodos disponíveis para o diagnóstico laboratorial envolvem várias técnicas microscópicas, cultura *in vitro*, sorológicas e moleculares (SUNDAR; REI, 2002; SAVOIA, 2015). Destes, os métodos sorológicos são recomendados como escolha pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006), entretanto apresenta reações cruzadas com *Trypanosoma cruzi* e *L. braziliensis*. Além disso apresentam limitações para diagnóstico em pacientes imunossuprimidos ou co infectados pelo HIV (COTA et al., 2013).

Os problemas de resultados falso-negativos pela sorologia podem ser resolvidos por técnicas mais sensíveis, como as técnicas moleculares, em especial a reação em cadeia pela polimerase (PCR), que apresenta elevada sensibilidade (COLOMBO et al., 2015). Contudo a falta de correlação entre a sorologia e níveis de ácidos nucleicos representa um problema no diagnóstico da LVH (SUNDARSHAN; SUNDAR, 2014). Neste panorama, a PCR quantitativa (qPCR) tem demonstrado ser uma importante ferramenta diagnóstica, podendo resolver problemas de diagnóstico de paciente assintomáticos e imunossuprimidos, além de demonstrar a remissão, cura e até mesmo a reincidência da doença (MOTAZEDIAN et al., 2008; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015). Novas técnicas moleculares e rastreio de novos biomarcadores podem melhorar acurácia nos ensaios diagnósticos. Neste panorama, tivemos por objetivo realizar um estudo comparativo dos métodos de diagnóstico para LVH, utilizando ensaios moleculares e teste rápido.



## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 População de estudo

A amostra consistiu de sangue periférico de 79 pacientes atendidos no Instituto de Doenças Tropicais “Natan Portella” (IDTNP). Foram considerados aptos para participar os pacientes que apresentaram diagnóstico para LV através de visualização do parasita em punção de medula óssea. Os dados clínicos foram coletados dos prontuários dos pacientes. Os pacientes foram incluídos após a assinatura do termo de consentimento. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal do Piauí (UFPI) (40374714.8.0000.5214). Foram considerados para controle negativo 39 pacientes atendidos que não foram diagnosticados por microscopia direta, cultura, testes sorológicos e moleculares.

### 2.2 Teste rápido

Para o teste sorológico foi utilizando o teste rápido OnSite Leishmania IgG/igM Combo (CTK Biotech, CA, USA). Foram usados 20  $\mu\text{L}$  de plasma/soro, ou 50  $\mu\text{L}$  de sangue, em seguida foi adicionado duas gotas de diluente, os resultados foram lidos após 15 minutos.

### 2.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi obtida de 200  $\mu\text{L}$  de creme leucocitário usando o mini kit Pure Link DNA (Life Technologies Carlsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA e a pureza foram medidas com espectrofotômetro (NanoDrop™ 2000 Thermo Scientific Inc., Wilmington, DE) utilizando comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, as amostras foram ajustadas para concentração final de 10 ng/  $\mu\text{L}$  para reação de qPCR.

### 2.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

O sangue foi centrifugado (3000 rpm por 5 minutos) e separado 800  $\mu\text{L}$  de creme leucocitário que foi transferido para tubo contendo 1200  $\mu\text{L}$  de RNAlater (Invitrogen Carlsbad, CA, USA), a amostra foi estocada continuamente a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a extração de RNA. Para extração de RNA foram utilizados 1000  $\mu\text{L}$  da amostra preservada, usando o kit SV

Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Durante a extração as amostras foram tratadas com DNase. Posteriormente foram sintetizadas as bibliotecas de cDNA utilizando o kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems, Califórnia, USA). A concentração e pureza do RNA e cDNA foram medidos em NanoDrop™ 2000 nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. O cDNA foi diluído para concentração final de 200 ng/μl para as reações de quantificação.

## 2.5 Construção da curva padrão

Um isolado (MHOM/BR/2016/5745) de *L. infantum* (50 μL) obtido de um paciente de Teresina que foi tratado e curado, foi inoculado em 1 mL de NNN (meio Novy-McNeal-Nicolle) e meio Schneider (Schneider's Insect Medium, Sigma, St. Louis, EUA), a cultura foi incubada durante cinco dias a 27°C. No quinto dia, os parasitas foram contados em uma câmara Neubauer. Para extrair o DNA e RNA,  $5 \times 10^6$  parasitas foram centrifugados a 1200 g durante 10 minutos. Após centrifugação, o sedimento foi lavado três vezes em solução RPMI e lavado uma vez em 200 μL de solução salina estéril. Para gerar a curva padrão, as amostras de DNA foram ajustadas para o equivalente a  $2,5 \times 10^4$  parasitas / mL em água pura, seguidas de diluições seriadas ( $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ).

## 2.6 qPCR de DNA RT-qPCR

A detecção e quantificação de DNA e cDNA de *L. infantum* foi realizada através de uma série de reações de qPCR usando a tecnologia de sondas de hidrólise (Taqman®), conforme descrito por Rolão *et al.* (2004). Os oligonucleótidos e as sondas foram concebidos com base na sequência de minicírculo de kinetoplastos (kDNA) de um isolado de *L. Infantum* (MHOM/BR/2016/5745). As sequências utilizadas para a detecção foram Linf kDNA-R 5'-GGCGTTCTGCAAAATCGGAAAA-3', Linf kDNA-R 5'-CCGATTTTTGGCATTTTTGGTCGAT-3', e Linf kDNA\_FAM-5'-TTTGAACGGGATTTCTG-3' (AF Genbank número de acesso 169140). Para o sistema de SYBR Green, para quantificação das bibliotecas de cDNA, foram utilizados os primers para a proteína HSP70 descrito por Sudarshan, Sundar (2014), senso e (FAGAGGTGCAGTCCCTCGTGT) e anti-senso (R CCTCCGTCTGCTTGCTCTTG) (Tabela 1). As reações foram realizadas em um volume final de 20 μL, com 4 μL de amostra de DNA (10 ng), 0,5 μL de sondas personalizadas (2,5 pmol) e iniciadores (10 pmol) (Custom

TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Foster City , CA, EUA), 10 µL de 1x master mix (TaqMan® Gene Expression Assays Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 5,5 µL de água estéril ultra pura, em placas de 96 poços usando o Sistema de PCR em Tempo Real 7500 (Biosistemas Aplicados, Foster City, CA, EUA). Após a desnaturação inicial durante 10 min a 95°C, as amostras foram submetidas a 40 ciclos de amplificação consistindo em duas etapas: 15 seg a 95°C e 1 min a 60°C. A curva padrão foi em duplicata, e foram adicionados a cada placa dois controles negativos compostos pela mistura de reação com água em vez de amostra de DNA.

Tabela 1 - Sequências de iniciadores para qPCR.

Primer	Sequência F		Sequência R		Sonda	
Taqman	Linf	kDNA-F	Linf	kDNA-R	Linf	kDNA_FAM-
kDNA	5'GGCGTTCTGCAAAA		5'CCGATTTTTGGCATT		5'TTTGAACGGGAT	
	TCGGAAA3'		TTGGTCGAT3'		TTCTG3'	
SYBR	5'GAAGAGGTGCAGT		5'CCTCCGTCTGCTTGCT			-
HSP70-I	CCCTCGTGT3'		CTTG3'			

## 2.7 Análise estatística

Todos os dados coletados foram importados de uma planilha Microsoft Excel 2003® e a análise estatística foi realizada usando o Stata / SE® 10.0 para Windows (College Station, Texas, EUA). Foram calculados médias e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) de variáveis não-normalmente distribuídas, bem como medianas. O teste de Spearman e Kappa foram aplicados para verificar a correlação e concordância entre as formas diagnósticas.

## 3 Resultados

### 3.1 Caracterização da população de estudo

Dentre os pacientes estudados, 18 são do sexo feminino (23%) e 61 do sexo masculino (77%). A idade dos pacientes variaram de um a 83 anos com média de 34 anos (CI 95%, 30; 38), oito (10,12%) tinham idade inferior ou igual a 5 anos, três (3,8%) tinham idade

entre 5 e 15 anos, 39 (49,37%) tinham idade entre 16 e 40 anos e 29 (36,71%) tinham idade superior a 40 anos. 20 (29%) são positivos para o vírus HIV e 49 (61%) negativos. Destes co infectados, quatro são do sexo feminino e 16 do sexo masculino. Dos pacientes estudados apenas três (3,79%) evoluíram para óbito, todos adultos e do sexo masculino, e dois eram co infectados pelo HIV (Tabela 1).

Tabela 2 - Descrição da população estudada de pacientes calazar do Novo Mundo, em Teresina, Brasil.

Características	Número (%)
Idade (Ano)	
$\leq 5$	08 (10,12)
$5 < 15$	03 (3,80)
$15 < 40$	39 (49,37)
$> 40$	29 (36,71)
Gênero	
Feminino	18 (23)
Masculino	61 (77)
Infecção pelo HIV	
Positivo	20 (29)
Negativo	49 (61)
Mortalidade	
Não óbito	76 (96,2)
Óbito	03 (3,8)
Total	79

### 3.2 Construção da curva padrão

A sensibilidade da reação qPCR foi testada usando diluições seriadas do DNA e RNA do parasita extraído de cultura (*L. infantum*). Esta sensibilidade permitiu um limite de detecção de 0,1 parasitas/ mL de sangue. A curva padrão do DNA e RNA utilizando Taqman, mostrou boa eficiência (Slope: -3,352,  $r^2$ : 0,999, eficiência: 98,74). A curva padrão do RNA utilizando o sistema SYBR Green apresentou boa eficiência (Slope: -3,387,  $r^2$ : 0,999, eficiência: 97,35).

### 3.3 Comparação dos testes diagnósticos

Pelo método sorológico, 61/78 pacientes com calazar foram positivos, apresentando uma sensibilidade de 78% (95% IC: 67;87) e especificidade de 86% (95% IC: 59;98). A

cultura de medula óssea demonstrou sensibilidade de 46% (34;59). Para os métodos moleculares, para quantificação do DNA por qPCR apresentou 74/79 pacientes positivos com sensibilidade de 95% (95% IC: 86;98) e especificidade de 100%. Para qRT-PCR utilizando o sistema SYBR Green, 41/79 pacientes foram positivos com sensibilidade de 64% (95% IC: 52;75) e especificidade de 82% (95% IC: 66;92). Para qRT-PCR utilizando o sistema Taqman, todos pacientes foram positivos com sensibilidade de 100% e especificidade de 95% (95% IC: 83;99) (Tabela 2). O teste Kappa, demonstrou concordância de fraca quanto comparado a qPCR de DNA com a cultura (46,69%; Kappa= 0,0331), os demais testes não apresentaram concordância.

Tabela 3 - Sensibilidade e especificidade de diferentes testes diagnósticos em pacientes com calazar em Teresina, 2018.

Tipo do teste	Alvos moleculares (Amostras de sangue total)					Testes Padrão	
	DNA		RNA		Cultura de medula óssea <sup>1</sup>	Teste rápido rK39 <sup>2</sup>	
	Taqman	Taqman	Taqman	SYBR Green			
<b>Sensibilidade</b> (VP/T/ %/ IC 95%)	74/79 <sup>3</sup> (94) (86;98) <sup>4</sup>	74/74 (100)	50/78 (64) (52; 75)	32/69 (46) (34; 59)	61/78 (78) (67; 87)		
<b>Especificidade</b> <sup>5</sup> (VN/T/ %/ IC 95%)	39/39 (100)	37/39 (95) (83; 99)	32/39 (82) (66; 92)	Nenhum	15/13 (86) (59; 98)		

1: As medulas ósseas eram cultivadas em meio Novy-MacNeil-Nicolle-NNN / Schneider. A identificação das promastigotas foi realizada após 2, 3, 7, 14, 21 e 28 dias após a cultura. 2: Ensaio imunocromatográfico com antígeno rK39 - Detecção Kalazar (InBios International, Seattle, WA). 3: Número de testes positivos / Total testado. 4: Intervalo de confiança de 95%. 5: Cálculo do teste de especificidade foi realizado em pacientes negativos para calazar da mesma instituição.

## 4 Discussão

Nossa população de estudo possui maior número de adultos do sexo masculino, embora possa não representar a distribuição de pacientes com calazar, este achado está de acordo com a distribuição da média brasileira, que corresponde a 91,6% (BBRASIL, 2015), e contrário aos estudos descritos por Zacarias et al. (2017) e Albuquerque et al. (2009). Não foi verificado diferença estatística nas medianas de acordo com sexo, faixa etária e infecção pelo HIV. Apesar da taxa de co-infecção do HIV encontrada ser maior do que a média brasileira, inferior à relatada na Etiópia, e muito maior do que a identificada anteriormente no resto da África Oriental e Bihar, na Índia (ZACARIAS et al., 2017; LINDOSO et al., 2014).

A implementação de medidas eficazes para controlar LV é cada vez mais urgente devido à disseminação desta doença endêmica em áreas urbanas. Testes de diagnóstico são essenciais para identificar as áreas com taxas de transmissão mais elevadas (MARQUES et al., 2012). A sensibilidade do teste rápido contra o antígeno rK39 demonstrou sensibilidade (77,2%) e especificidade (88,2%), e inferior ao estudo multicêntrico realizado por Assis et al. (2008), que encontrou sensibilidade de 93% e especificidade de 97%. Comparações de vários testes sorológicos geralmente demonstram baixos níveis de concordância com os resultados obtidos em indivíduos assintomáticos em regiões endêmicas (SILVA et al., 2011). Este fato pode ser explicado devido a limitações sofridas pelos testes sorológicos, graças ao tempo que os anticorpos anti leishmania permanecem detectáveis, podendo durar de meses a anos após o tratamento. Associado a este fato, na co infecção pelo HIV, os métodos sorológicos apresentam baixa sensibilidade, uma vez que a titulação de anticorpos reduz devido à ação imunossupressora do vírus (SAVOIA, 2015), e por esse motivo os ensaios sorológicos não são confiáveis nessa população (LEMOS, 2014).

Ademais, em áreas endêmicas, indivíduos saudáveis podem ser positivos nestes testes de detecção por causa de infecção assintomática ou eliminação incompleta do parasita em infecções passadas (GIDWANI et al., 2011). Apesar disso, o teste rápido contra o antígeno rK39 é ineficaz em certas regiões do mundo, como na África, onde os indivíduos infectados possuem anticorpos rK39 baixos (FONSECA, 2013).

À luz desse fato, os métodos moleculares foram considerados um importante complemento para a detecção sorológica de pacientes com calazar. A literatura mundial aponta para a ausência de um padrão-ouro para o diagnóstico de infecção por *L. infantum* (WILSON, 1995; IKONOMOPOULOS et al., 2003). Assim, na tentativa de contribuir para um diagnóstico confiável de LV e superar as dificuldades encontradas com os métodos

tradicionais, um sistema baseado em qPCR foi desenvolvido. Os ensaios de rotina qPCR avaliados neste estudo utilizaram as diretrizes do MIQE (BUSTIN et al., 2009). As curvas padrão foram geradas usando um isolado local de *L. infantum* e diluídas de forma seriada. A curva padrão manteve a linearidade em todos os ensaios, o que também foi observado nas experiências de Nicolas et al. (2002), Mary et al. (2004) e Solano-Gallego et al. (2007), mostrando boa eficiência das reações.

Ensaios moleculares são mais robustos para o diagnóstico de LV, a sensibilidade para qPCR de DNA (100%) foi semelhante aos trabalhos de Sundar et al. (2005), Winter-Foeter (2010), Pace (2014), Ceccarelli et al. (2014) e Silva et al. (2016). Para a qRT-PCR, o sistema Taqman apresentou melhor sensibilidade e especificidade quando comparado ao sistema baseado em SYBR Green. Utilizando o sistema SYBR Green, nosso ensaio mostrou sensibilidade semelhante ao trabalho de Gomes et al. (2017) e maior que os estudos de Pereira et al. (2014) e Marques et al. (2012). Essas diferenças de sensibilidade do RNA pode ser explicada pela natureza distintas das tecnologias, que podem ter influenciado na acurácia dos testes.

O teste Kappa teve concordância para o qPCR de DNA e cultura, fato não observado para o teste rápido e RT-qPCR. Essa baixa concordância do RNA pode ser explicada pelo reduzido número de parasitas circulantes em sangue periférico. Houve baixa correlação entre DNA e RNA do parasita com o ensaio sorológico, fato também observado por Marques et al. (2012). Além disso, as técnicas são baseadas em diferentes parâmetros para detectar infecção, titulação de anticorpos e ácidos nucleicos.

As técnicas moleculares, especialmente o qPCR, podem ser ideais para estudos epidemiológicos porque podem detectar e quantificar ácidos nucleicos de *Leishmania sp.*, demonstrando ser um marcador confiável de infecção. No entanto, a maior complexidade e custo envolvidos na realização de qPCR em um grande número de amostras, em comparação com a complexidade e o custo associado aos testes imunológicos, devem ser levados em consideração.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE P.L., et al. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceara, Brazil. **Rev Panam Salud Publica.**, v. 26, n. 4, p. 330-333, 2009.

ASSIS, T. S. M. D., et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral humana. **Epidemiol Serv Saúde.**, v. 17, n. 2, p. 107-116, 2008.

BBRASIL. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**, 1th ed. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília. 2006. Available at: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_leish\\_visceral2006.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf). Acessado em Dezembro de 2017.

BRASIL. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**, 1th ed. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília. 2015. Available at: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_leish\\_visceral2006.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf) Acessado em Dezembro de 2017.

BUSTIN, S.A., et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clin Chem.**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CECCARELLI M., et al. Detection and Characterization of Leishmania (Leishmania) and Leishmania (Viannia) by SYBR Green-Based Real-Time PCR and High Resolution Melt Analysis Targeting Kinetoplast Minicircle DNA. **PLOS ONE.**, v. 9, n. 2, e88845, 2014.

CHAPPUIS, F., et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol.**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

COLOMBO, F.A., et al. Performance of a real time PCR for leishmaniasis diagnosis using a L. (L.) infantum hypothetical protein as target in canine samples. **Exp Parasitol.**, v. 157, p. 156-162, 2015.

COTA G.F., et al. Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 89, n. 3, p. 570-577, 2013.

DI MUCCIO, T., et al. Correction: Epidemiology of imported Leishmaniasis in Italy: Implications for a European Endemic Country. **PLoS ONE.**, v. 10, n. 7, 2015.

DHINGRA, K. K., et al. Morphological findings in bone marrow biopsy and aspirate smears of visceral Kala Azar: a review. **Indian J Pathol Microbiol.**, v. 53, n. 1, p. 96-100, 2010.

ELMAHALLAWY, E., et al. Diagnosis of leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries.**, v. 8, n. 8, p. 961–972, 2014.

FONSECA, A.M. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral utilizando proteínas de leishmania infantum com função desconhecida**, 74f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, 2013.

GIDWANI, K., et al. Persistence of *Leishmania donovani* antibodies in past visceral leishmaniasis cases in India. **Clin Vacc Immunol.**, v. 18, n. 2, p. 346–348, 2011.

GOMES, M. V. C., et al. Field Validation of SYBR Green and TaqMan Based Real-Time PCR Using Biopsy and Swab Samples To Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an Area Where *Leishmania (Viannia) braziliensis* Is Endemic. **J Clin Microbiol.**, v. 55, n. 2, p. 526-534, 2017.

IKONOMOPOULOS, J., et al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the propose assay on clinical samples. **Veterin Parasitol.**, v. 113, p. 99-113, 2003.

LEMOS, L. C. D. **Expressão heterológica da rKDDR de leishmania infantum: um novo antígeno recombinante para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral**. 100f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, 2014.

LINDOSO, J. A., et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PLOS Negl Trop Dis.**, v. 8, n. 9, p. e3136, 2014.

MARQUES, L. H. S., et al. Low Parasite Load Estimated by qPCR in a Cohort of Children Living in Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLOS Negl Trop Dis.**, v. 6, n. 12, e1955, 2012.

MARY, C., et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. **J Clin Microbiol.**, v. 42, n. 11, p. 5249-5255, 2004.

MOTAZEDIAN, M., et al. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. **Diagn Microbol Infect Dis.**, v. 60, n. 2, p. 151-154, 2008.

NICOLAS, L. E., et al. Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues. **J Clin Microbiol.**, v. 40, p.1666-1669, 2002.

PACE, D. Leishmaniasis. **J Infect.**, v. 69, p. 10-8, 2014.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clin Epidemiol.** 2014, 6: 147-54.

PAIVA-CAVALCANTI, M., et al. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. **Cell and Bioscience**, v. 5, pp. 31, 2015.

PEREIRA, M. R., et al. Comparison between Conventional and Real-Time PCR Assays for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **BioMed Res Int.**, v. 2014, p. 4, 2014.

ROLÃO, N., et al. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. **J Parasitol.**, v. 90, n. 5, p. 1150-1154, 2004.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **J Inf Dev Ctries.**, v. 9, n. 6, p. 588-596, 2015.

SILVA, L. A., et al. Antileishmania immunological tests for asymptomatic subjects living in a visceral leishmaniasis-endemic area in Brazil. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 84, n. 2, p. 261–266, 2011.

SILVA, J. C., et al. Comparison of optical microscopy and quantitative polymerase chain reaction for estimating parasitaemia in patients with kala-azar and modelling infectiousness to the vector *Lutzomyia longipalpis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 111, n. 8, p. 517-522, 2016.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J Clin Microbiol.**, v. 39, p. 560-563, 2015.

SRIVIDYA, G., et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: Developments over the last decade. **Parasitol Res.**, v. 110, p. 1065-1078, 2012.

SUNDAR S., RAI M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.9, n.5, Sep, p.951-8. 2002.

SUNDAR, S., et al. Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex agglutination test. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 73, n. 2, p. 269–271, 2005.

SUNDARSHAN, M.; SUNDAR, S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, New York, v. 80, n. 1, p. 40-42, set. 2014.

WINTER-FLOETER, L. M. **Descrição e utilização de alvos moleculares para identificação de Leishmania por PCR.** New molecular targets for PCR identification of Leishmania. Universidade de São Paulo, 2010.

WILSON, S. M. DNA-based methods in the detection of Leishmania parasites: Fields applications and practicalities. **Ann Soc Belg Med Trop.**, v. 89, n. 1, p. 95-100, 1995.

VEXENAT, A. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Rev Inst Med Trop São Paulo.**, v. 38, n. 3, p. 177-185, 1996.

ZACARIAS, D. A., et al. Causes and consequences of higher Leishmania infantum burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients. **Trop Med Int Health.**, v. 22, n. 6, p. 679-687, 2017.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. O desenvolvimento de testes moleculares aumentam a acurácia diagnóstica, e pode determinar a presença de parasitas viáveis e avaliar a infectividade.
2. A quantificação de RNAm demonstrou ser a estimativa mais fiel do número de parasitas vivos circulantes, em relação as testes parasitológico e sorológico.
3. A técnica de RT-qPCR demonstrou elevada sensibilidade e especificidade na demonstração de parasitas viáveis, é um campo promissor para diagnóstico fidedigno da parasitemia frente a ensaios tradicionais.
4. Ensaio moleculares de qPCR utilizando os sistemas Taqman e SYBR Green demonstraram elevada sensibilidade e especificidade quando comparado a cultura e teste rápido rK39.
5. Para quantificação de RNAm a tecnologia Taqman demonstrou elevada sensibilidade e especificidade quando comparado ao sistema SYBR Green.
6. Traça-se como perspectivas: (i) demonstrar a acurácia desta técnica frente a outros ensaios sorológicos, como o ELISA; (ii) validar o RT-qPCR, em substituição ao xenodiagnóstico, para diagnóstico de infectividade de LVH em pacientes imunocompetentes e co infectados pelo HIV.

## APÊNDICE I



### Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela – IDTNP

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: **Utilização de novas técnicas de quantificação para determinar parasitemia e carga parasitária em pacientes com Leishmaniose visceral**

Pesquisador responsável: Carlos Henrique Nery Costa

Instituição/Departamento: Universidade Federal do Piauí/ RENORBIO

Telefone para contato (inclusive a cobrar): (86) 99339331/ 3222-4812

Pesquisadores participantes: Eliamara Barroso Sabino

Telefones para contato: (86) 99339331/ 3222-4812

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma.

O projeto visa desenvolver uma metodologia capaz de identificar amastigotas de *Leishmania* em pacientes infectados. Trata-se de projeto experimental, utilizando amostras biológicas de seres humanos (medula óssea e sangue periférico). Cada paciente incluído no estudo será submetido à anamnese e ao exame físico por médico envolvido na pesquisa. Serão coletados 3 mL de sangue total por punção de veia periférica em frascos estéreis e secos ou contendo 40 ml PBS contendo EDTA. A punção aspirativa de medula óssea será realizada para a pesquisa direta de parasitas. Os pacientes diagnosticados com Leishmaniose visceral por cultura, serão incluídos na pesquisa e será quantificado parasitemia e carga parasitária, por citometria de fluxo, qPCR e microscopia óptica. Pretende-se avaliar sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de parasitemia e carga parasitária em pacientes com Leishmaniose visceral, bem como quantificação de RNA. Para tal, parte do protocolo envolve xenodiagnóstico, que não representa perigo ou promoverá danos ao paciente. O projeto de pesquisa não oferece riscos ao sujeito da pesquisa nem ao pesquisador. O desenvolvimento de testes laboratoriais que determinem a carga parasitária do paciente, e avalie a gravidade dos casos, auxilia na orientação do médico quanto a determinação da terapêutica a ser adotada como, por exemplo, a internação do paciente. O desenvolvimento desta proposta de pesquisa constitui um desafio para as políticas de saúde e para a sociedade científica, transformando anos de pesquisas em testes laboratoriais, que possam ter aplicabilidade direta aos portadores desta parasitose.

Consentimento da participação da pessoa como sujeito

Eu, \_\_\_\_\_, RG.: \_\_\_\_\_/ CPF.: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_/ n.º de prontuário.: \_\_\_\_\_/ n.º de \_\_\_\_\_

matrícula \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo **“Utilização de novas técnicas de quantificação para determinar parasitemia e carga parasitária em pacientes com Leishmaniose visceral”**, como sujeito. Fui suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Utilização de novas técnicas de quantificação para determinar parasitemia e carga parasitária em pacientes com Leishmaniose visceral”. Eu discuti com o Dr. Carlos Henrique Nery Costa, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu acompanhamento/ assistência/tratamento neste Serviço.

Local e data \_\_\_\_\_

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável: \_\_\_\_\_

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: \_\_\_\_\_

—

RG: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

—

RG: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Teresina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

-----

Carlos Henrique Nery Costa

Observações complementares

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato: Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI - Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Bairro Ininga. Centro de Convivência L09 e 10 - CEP: 64.049-550 - Teresina - PI ; tel.: (86) 3215-5734 - email: cep.ufpi@ufpi.edu.br web: www.ufpi.br/cep

## ANEXO I



## COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Utilização de novas técnicas de quantificação para determinar parasitemia e carga parasitária em pacientes com Leishmaniose visceral

**Pesquisador:** Carlos Henrique Nery Costa

**Versão:** 3

**CAAE:** 40374714.8.0000.5214

**Instituição Proponente:** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

## DADOS DO COMPROVANTE

**Número do Comprovante:** 000522/2015

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

Informamos que o projeto Utilização de novas técnicas de quantificação para determinar parasitemia e carga parasitária em pacientes com Leishmaniose visceral que tem como pesquisador responsável Carlos Henrique Nery Costa, foi recebido para análise ética no CEP Universidade Federal do Piauí - UFPI em 06/01/2015 às 11:48.

**Endereço:** Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa  
**Bairro:** Ininga **CEP:** 64.040-550  
**UF:** PI **Município:** TERESINA  
**Telefone:** (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



## ANEXO II

BioMed Research International

### **Advances in laboratory diagnosis Kala-azar**

Eliamara Barroso Sabino,<sup>1</sup> Vladimir Costa Silva,<sup>1</sup> Carlos Henrique Nery Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Piauí (UFPI). Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).  
Teresina, Piauí (PI), 64052370, Brazil.

Correspondence should be addressed to Eliamara B. Sabino; eliamarabs@hotmail.com

#### **Abstract**

Visceral leishmaniasis (VL), or kala-azar, is a serious chronic disease caused by *Leishmania donovani* and *L. infantum* species. The laboratory diagnosis is based on several methods of identification of the parasite, such as serological and parasitological techniques that may aid in its diagnosis, however, it is necessary to associate other techniques to ensure accurate and accurate results. Molecular analyzes such as conventional and quantitative PCR have shown high sensitivity and specificity in screening of genes present in DNA and expressed in RNA from circulating parasites. Molecular techniques present a promising area for the diagnosis and determination of parasitemia and infectivity in asymptomatic cases and in immunosuppressed patients with Kala-azar.

#### **1. Introduction**

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected disease caused by the species *Leishmania donovani* and *L. infantum* and transmitted by the bite of infected sandflies. Domestic dogs are considered the primary reservoir and a risk factor for human anthropic visceral infection [1, 2, 3]. Among all parasitic diseases, leishmaniasis is the third most common cause of mortality after malaria and schistosomiasis [4].

The kala-azar in endemic areas is clinically diagnosed, more frequently the signs and symptoms are inconclusive and confused with other coendemic diseases [5-8]. The available methods for laboratory diagnosis of VL involve several techniques, such as tissue parasite demonstration, in vitro culture, serological and molecular techniques [9].

However, there is no laboratory technique capable of accurately measuring the amount of viable parasites and determining infectivity. In this sense, xenodiagnosis is still considered the test of choice to determine infectivity, but it is not effective in asymptomatic patients or with low parasitemia [10,11]. Serological tests have limitations because they are highly diagnostic in immunocompetent patients but are not reliable for immunosuppressed or HIV-infected individuals [12].

The complications in patients with VL as the kala-azar dermal manifestation (PKDL), is characterized by a rash and absence of systemic parasitemia, makes the diagnosis complicated [13]. In this sense advances in molecular diagnosis have been shown to be an important tool for traditional diagnostic difficulties, demonstrating the presence of viable parasites and determining the infectivity of reservoirs [14]. The screening of genes and new molecular targets are fundamental for the human diagnosis, being able to bring improvements in the prognosis and treatment of patients with kala-azar.

## **2. Conditions for Diagnosis**

The visualization of the parasite is considered the gold standard in the diagnosis of VL. The parasitological examination consists first of the microscopic investigation of the amastigote forms in material, later in the isolation in vitro culture to confirm the etiologic agent and later identification of the species of *Leishmania* sp. involved [9].

Microscopy has high specificity, and amastigote forms can be observed in the tissues of the liver, bone marrow, lymph nodes and spleen. However, this method may be influenced by the tissue or biological sample collected, the analyst and the time spent on the active search on a slide [15]. Sensitivity in the detection of amastigote forms in bone marrow smears has a sensitivity of 70% [16], but may exceed 95% when the material is examined by an experienced technician for 60 minutes [17].

Microscopic examination of the splenic aspirate has a high sensitivity of 95% to 98%, but requires invasive procedures with potentially serious complications, even with the techniques considered safer [18]. An alternative is hepatic biopsy, with sensitivity varying from 53% to 86%, and may be higher in patients co-infected with HIV [17]. Lymph node aspiration for direct microscopic examination has sensitivity varying from 52 to 58%. The lower sensitivity is observed in peripheral blood smears, since parasitemia in immunocompetent individuals is low [19].

Tissue biopsy has also demonstrated diagnostic power. LV can promote ulcerations, bleeding and perforations in the digestive system, so intestinal biopsy is valuable for studying the immune response due to lymphocytic infiltrate, resembling other organs such as liver and spleen. The presence of parasites in the duodenum is a common event in patients with kalazar and in HIV-infected patients it becomes even more frequent [20].

According to Zijlstra (2016), PKDL is a common complication of visceral leishmaniasis (LV) caused by *Leishmania donovani*. Due to its possible role in transmission, it is considered a public health problem in the endemic areas. Clinical features include a rash consisting of macules, papules, or nodules. In this sense, lesion biopsy of these patients, with identification of the parasite, constitutes a good form of diagnosis.

Tissue culture plays an important role in the diagnosis. Bone marrow culture has sensitivity of approximately 70% and peripheral blood leukocyte cream culture reaches 60% sensitivity, approximates to 70% in patients infected with HIV and can be useful in situations in which bone marrow aspirate can not be made viable [16]. The culture of splenic aspirates or aspirates of bone marrow has high specificity, although it is tedious, time consuming, requires experience, expensive equipment and therefore restricted to reference research centers and hospitals 5. The diagnostic sensitivity can be improved, with development of the microculture method for parasite isolation [21]. In addition to the variability in their sensitivity, parasitological tests are invasive, making them difficult to perform under field conditions. In this sense the serological tests are the choice for the diagnosis of VL, presenting good sensitivity. The immunofluorescence test is recommended by the Ministry of Health in Brazil and has a sensitivity ranging from 50 to 95% [22,23].

In this sense the research of antigens in other biological fluids has been demonstrating power in the diagnosis of VL. Singh et al. (2009) and Mohapatra et al. (2014) report in their studies that various biological fluids can be used for diagnosis, the use of sputum and urine of patients with kala-azar show good results. Studies have shown that the search for rK39 antigens, using saliva from impuoment patients, showed sensitivity of 58.6% [26]. Intra-titration of antibodies may influence the diagnosis, which suggests that saliva is not a good way to diagnose VL. Screening for rK39 using urine has been shown to be adequate for the diagnosis of VL, for monitoring of treatment, and for the detection of subclinical infection [27,9]. However, Lemos (2014) reports that for a good diagnosis it is necessary to collect a large volume of urine, to avoid false negatives. It reports that the quality of the diagnosis is dependent on the patient's immunological profile, demonstrating that preferentially in people with compromised immune systems the results are not reliable.

### 3. Available diagnostic technologies

There are several methods for the serological diagnosis of VL due to high antibody production and hypergammaglobulinemia [26]. Among the tests, the following stand out: direct agglutination test (DAT), indirect fluorescent antibody test (IFAT), indirect hemagglutination test (IHA), immunoenzymatic assay (ELISA) and immunochromatographic tests (ICTs). Serological tests are most commonly used for the diagnosis of VL and are sensitive, but specificity may vary [9,29,30].

Among the enzymatic assays, ELISA is the most used method, since it is able to process several samples at the same time and presents high sensitivity. It makes use of several antigens, such as gp63, gp70, gp72 and rK39, which may affect its sensitivity and specificity. However, there is a possibility of cross-reactivity with similar antigens belonging to other diseases [31]. RK39 has exceptional sensitivity and specificity but is ineffective in certain regions of the world, such as in Africa, where infected individuals have low rK39 antibodies [15,28]. Serological tests such as ELISA and RIFI are not fully used in the field due to lack of adaptation, however, the direct agglutination test (DAT) is easy to handle and use [28].

DAT is simple and low cost, with sensitivity and specificity between 70 and 100% [32] and has proved useful as the first diagnostic tool in endemic area. An alternative is immunochromatographic tests, which have sensitivity above 98%, are easy to perform and interpret, do not require laboratory infrastructure, do not require specialized laboratories, and are currently promising for rapid diagnosis in endemic areas [33]. A multicenter study with a commercial test for antibody detection against *L.chagasi* rK39 antigen performed in Brazil showed 93% sensitivity and 97% specificity [34] and opens the prospect for rapid diagnosis, easy to perform and interpretation.

KAtex detects a low molecular weight (5-20 kD) glycoconjugate, a heat stable carbohydrate antigen in the urine of patients with VL, it can be detectable up to six months after treatment. The method is appropriate for the diagnosis of primary VL, to monitor the efficacy of the treatment and for the detection of subclinical infection [35]. Second author Sundar and Chakravarty (2015), KAtex has positive predictive value, high specificity of 82 to 100% and variable sensitivity of 47 to 95%.

Anti-leishmania antibodies remain detectable for months or years after the patient's treatment, however relapse of the infection is difficult to diagnose. In addition, comparisons of several serological tests generally demonstrate low levels of concordance with results obtained in asymptomatic individuals in endemic regions [37]. In addition, in endemic areas

healthy individuals may be positive in these detection tests because of asymptomatic infection or incomplete elimination of the parasite in past infections [38]. Serological methods have been shown to be of low sensitivity in HIV co-infection, since the determination of antibodies is difficult due to the immunosuppressive action of the virus [9].

#### **4. Molecular strategies and new diagnostic perspectives**

The most commonly used molecular technique is polymerase chain reaction (PCR), which uses various clinical materials such as bone marrow, serum, urine, whole blood, skin, lymph node, among others, for identification through molecular targets [15].

PCR has been used when microscopy and serology are ineffective, including post-treatment monitoring. Detection of DNA from the parasite in the blood, bone marrow or biopsy specimens is promising [19,26]. Conventional CRP is unable to differentiate between clinically active VL from asymptomatic infections. These disadvantages can be overcome by quantitative PCR [58].

Real-time quantitative PCR (qPCR) have been demonstrated as important diagnostic tools, quantifying parasites and demonstrating gene expression [39,40]. It is an important tool to monitor the patient, as it quantifies the parasite load instantaneously, demonstrating the number of parasites present in a determined sample volume [41,42]. It presents sensitivity superior to the direct research and has sensitivity comparable to the research of amastigotes in splenic aspirate. It can monitor parasitic burden in asymptomatic patients, during treatment, and in the identification of recurrences [18,37,43, 44, 58].

Conserved domains of minicubes have been used as targets for DNA amplification of *Leishmania* sp. [45,46]. The qPCR using kinetoplast DNA primers in blood samples showed 100% sensitivity [47, 48]. A number of target sequences have been screened for LV diagnosis, including kinetoplast, rRNA, 18SRNA, mini exon-derived RNA genes, alpha tubulin gene region, gp63 locus, internal transcript intercalation regions, and HSP70 [5]., 49].

The sensitivity of qPCR in immunocompetent individuals for blood and bone marrow samples is similar. In the last decade, DNA demonstration of the parasite in urine samples from immunocompetent patients demonstrated high sensitivity (96.6%) and specificity (100%). More recently, qPCR in other fluids demonstrated sensitivity of 94.6%, with a specificity of 90%. However, its value as a tool to monitor patients with HIV infection continues to be proven [58,50]. In patients infected with HIV, it has been shown that the high initial parasitic load, quantified by qPCR, predisposes the patient to a greater risk of clinical

recurrence [51]. Pereira et al. (2014) demonstrated that qPCR in immunosuppressed patients complies with conventional PCR, with sensitivity of 100%. Critical adjustments in intra-laboratory conditions are essential to ensure efficiency and sensitivity.

The determination of infectivity in patients with kala-azar is through xenodiagnosis, however studies by Ferreira et al. (2017), demonstrated a low correlation of xenodiagnosis and DNA levels in patients co-infected with HIV. The presence of DNAemia may overestimate parasite quantification, not demonstrating the presence of viable parasites circulating in peripheral blood when compared to microscopy [52-54]. RNA quantification studies could determine the presence of viable parasites and determine the infectivity in endemic areas.

In this scenario the plasma / serum RNA dosage is an emerging field for noninvasive diagnostic applications. RNA findings opened a new field for the study of noninvasive gene expression [55]. In this sense new therapeutic targets are investigated, such as *ccl2* mRNA [56] and miRNA [57], and these can be used as a biomarker in the diagnosis, prognosis and therapy of *Leishmania* sp.

A promising approach to qPCR is the quantification of RNA transcript levels (qRT-PCR), it is considered one of the most sensitive, specific and rapid techniques in the molecular diagnosis in the screening of genes expressed in patients with VL, involving reverse transcription and analysis of the real-time PCR product [43,47,58,59]. QRT-PCR can be used as a diagnostic method by screening conserved sequences within the kinetoplast or rRNA gene of leishmania, especially in HIV co-infection, where parasite burden may occasionally be low [7, 14].

Although all the technology involved, qRT-PCR presents limitations due to the variations of reagents used, as well as to the thermocyclers, but mainly there are limitations in relation to the professional operators, concentration and RNA stability in biological samples [59].

Innovative molecular assays such as nucleic acid sequence based assay (NASBA) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) are used to detect *Leishmania* sp. NASBA is a powerful tool based on detection of leishmanial RNA that combines high sensitivity and specificity and can be applied to blood and differentiate other specimens of *Leishmania* sp. [60, 61]. Quantitative NASBA (QT-NASBA) is a variation of the method that targets 18S rRNA, homologous to all leishmania species, increasing its diagnostic value [14]. In addition, the NASBA method demonstrated greater efficacy than conventional PCR in

Sudan, where parasitemia is low. Such techniques are important for the diagnosis of species and identify polymorphisms for genotyping of several species of leishmania [62].

## 5. Conclusion

The cases of kala-azar currently have a greater distribution in urban areas, demonstrating its importance, the early diagnosis plays a fundamental role in combating this pathology. The diagnostic limitations must be overcome and government actions are fundamental for the scientific, technological development and innovation in health. Molecular techniques are more susceptible and can determine active infection and presence of viable parasites, proving their role in the quantification and determination of the infectiousness profile in urban areas.

## References

- [1] C. H. N. Costa, How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 44, no. 2, pp. 232-242, 2011.
- [2] J. Alvar, I. D. Vélez, C. Bern, M. Herreno, Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence, *PLoS ONE*, vol. 7, no. 5, 2012.
- [3] E.R. Adams, M.A. Gomez, L. Scheske, R. Rios, R. Marquez, A. Cossio, Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR, *Parasitology*, vol. 141, no. 14, pp. 1891–1897, 2014.
- [4] P. D. Ready, Epidemiology of visceral leishmaniasis, *Clinical Epidemiology*, vol. 6, pp. 147–154, 2014.
- [5] G. Srividya, A. Kulshrestha, R. Singh, P. Salotra, Diagnosis of visceral leishmaniasis: Developments over the last decade, *Parasitology Research*, vol. 110, pp. 1065–1078, 2012.
- [6] I. R. Barbosa, Epidemiologia da leishmaniose visceral no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Natal: Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção, 2013.

- [7] D. Pace, Leishmaniasis, **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, vol. 69, pp. 10–8, 2014.
- [8] P. Mansueto, A. Seidita, G. Vitale, A. Cascio, Leishmaniasis in travelers: A literature review, *Travel Medicine and Infectious Disease*, vol. 12, no. 6, pp.563–581, 2014.
- [9] D. Savoia, Recent updates and perspectives on leishmaniasis, *The Journal of Infection in Developing Countries*, vol. 9, no. 6, pp.588–596, 2015.
- [10] E. Miller, A. Warburg, I. Novikov, A. Hailu, P. Volf, V. Seblova, A. Huppert, Quantifying the contribution of hosts with different parasite concentrations to the transmission of visceral leishmaniasis in Ethiopia, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol.8, e3288, 2014.
- [11] Ferreira GR, Castelo Branco Ribeiro JC, Meneses Filho A, de Jesus Cardoso Farias Pereira T, Parente DM, Pereira HF, Carlos da Silva J, Zacarias DA, Vieira da Silva L, Medeiros Faustino SK, Almeida Neto WS, Costa DL, Lopes de Mendonça I, Nery Costa CH. Human Competence to Transmit *Leishmania infantum* to *Lutzomyia longipalpis* and the Influence of Human Immunodeficiency Virus Infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 98, no. 1, pp.126-133, 2017.
- [12] G. F. Cota, M. R. de Sousa, B. M. de Freitas Nogueira, L. I. Gomes, E. Oliveira, T. S. Assis, A. L. de Mendonca, B. F. Pinto, J. W. Saliba, A. Rabello, Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 89, no. 3, pp. 570-577, 2013.
- [13] E. E. Zijlstra, Visceral leishmaniasis: a forgotten epidemic, *Archives of Disease in Childhood*, vol.101, no. 6, pp.561-567, 2016.
- [14] W. Van der Meide, J. Guerra, G. Schoone, M. Farenhorst, L. Coelho, W. Faber, et al., Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites, *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 46, no. 1, pp. 73–8, 2008.
- [15] A. M. Fonseca, Diagnóstico da leishmaniose visceral utilizando proteínas de *leishmania*



*infantun* com função desconhecida, 74f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, 2013.

- [16] E. CHOUHI, et al., Cultures on NNN medium for the diagnosis of leishmaniasis, *Pathologie Biologie*, 2008.
- [17] E. S. Silva, C. M. Gontijo, M. N. Melo, Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species, *Trends in Parasitology*, vol. 21, pp. 550–552, 2005.
- [18] V. Seblova, *Phlebotomus orientalis* sand flies from two geographically distant Ethiopian localities: biology, genetic analyses and susceptibility to *Leishmania donovani*, ***PLOS Neglected Tropical Diseases***, vol. 7, no. 4, 2013.
- [19] A. Rabello, O. M. Disch, *Leishmania/HIV* co-infection in Brazil: an appraisal, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, vol. 97, pp.17-28, 2003.
- [21] E. Elmahallawy, A. S. Martinez, J. Rodriguez-Granger, Y. Hoyos-Malleco, A. Agil, J. M. N. Mari, Diagnosis of leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, vol. 8, no. 8, pp. 961–972, 2014.
- [22] Brasil, Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeccao *Leishmania-HIV* In: SdVe Saúde, Ed. Ministério da Saúde do Brasil, pp. 106, 2011b.
- [23] Brasil, *Leishmaniose Visceral: Recomendações Clínicas para Redução da Letalidade* In: SdVe Saúde., Ed. Ministério da Saúde do Brasil, pp. 77, 2011a.
- [24] D. Singh, K. Pandey, V. N. Das, S. Das, S. Kumar, R. K. Topno, P. Das, Novel noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by rK39 testing of sputum samples, *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 47, no. 8, pp. 2684-2685, 2009.
- [25] S. Mohapatra, J. C. Samantaray, A. A Ghosh, Comparative Study of Serum, Urine and Saliva Using rk39 Strip for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. ***Journal of Arthropod-Borne Diseases***, 2014.

- [26] M. R. Da Silva, N. A. Brandão, M. L. Dorta, R. D. Fátima, D. L Costa, C. H. Costa, M. A. Oliveira, Evaluation of an rK39-based immunochromatographic test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in human saliva”, *Tropical Biomedicine*, vol. 32, no. 2, pp. 247-56, 2015.
- [27] C. Riera, R. Fisa, P. Lopez, et al., Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of Leishmania antigen in urine of patients with HIV-Leishmania coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up, **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, vol. 23, no. 12, pp. 899-904, 2004.
- [28] L. C. D. Lemos, Expressão heterológica da rKDDR de leishmania infantum: um novo antígeno recombinante para o diagnóstico da leishmaniose visceral. 100f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, 2014.
- [29] F. Chappuis, S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. Peeling, Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, vol. 5, no. 11, pp. 873–882, 2007.
- [30] I. Rodriguez-Gonzalez, C. Marin, S. S. Longoni, H. Mateo, J. M. Alunda, G. Minay, R. Gutiérrez-Sánchez, F. Vargas, M. Sanchez-Moreno, Identification of New World *Leishmania* species from Peru by biochemical techniques and multiplex PCR assay, *FEMS*, vol. 267, 2006.
- [31] E. M. Xavier, Avaliação de uma nova abordagem diagnóstica baseada em um nanocompósito para a leishmaniose visceral. 83f. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.
- [32] M.J. Pedras, et al., Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.102, no.2, pp.172-8, 2008.
- [33] C. BERN, et al., The epidemiology of visceral leishmaniasis and asymptomatic leishmanial infection in a highly endemic Bangladeshi village, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.76, no.5, pp.909-14, 2007.
- [34] T. S. M. D. ASSIS, et al., Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH

para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana, *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, vol.17, no.2, pp.107-116, 2008.

- [35] I. Cruz, C. Chicharro, J. Nieto, B. Bailo, C. Canavate, M. C. Figueras, Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis, *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, no. 7, pp. 2343–237, 2006.
- [36] S. Sundar, J. Chakravarty, An Update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis, *Expert opinion on pharmacotherapy*, vol. 16, no. 2, pp. 237-252, 2015.
- [37] L. A. Silva, H. D. Romero, G. N. Nascentes, R. T. Costa, V. Rodrigues, A. Prata, Antileishmania immunological tests for asymptomatic subjects living in a visceral leishmaniasis-endemic area in Brazil, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 84, no. 2, pp. 261–266, 2011.
- [38] K. Gidwani, A. Picado, B. Ostyn, S. P. Singh, R. Kumar, B. Khanal, Persistence of *Leishmania donovani* antibodies in past visceral leishmaniasis cases in India, *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 18, no. 2, pp.346–348, 2011.
- [39] M. Motazedian, M. Fakhar, M. H. Motazedian, G. Hatam, F. Milaeili, A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 60, no. 2, pp. 151-154, 2008.
- [40] M. Paiva-Cavalcanti, R. C. S. Morais, R. Pessoa-E-Silvar, L. A. M. Trajano-Silva, S. C. Goncalves De Albuquerque, D. H. C. Tavares, Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools, *Cell and Bioscience*, vol. 5, pp. 31, 2015.
- [41] D. R. Pita-Pereira, M. P. Lins, R. B. Oliveira, B. A. Lima, O. C. Pereira, R. P. Moreira, C. Britto, SYBR Green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis, *Parasites & Vectors*, vol. 5, no.15, 2012.
- [42] P.K. Padmanabhan, C. Dumas, M. Samant, A. Rochette, M. J. Simard, B. Papadopoulou, Novel Features of a PIWI-Like Protein Homolog in the Parasitic Protozoan *Leishmania*, *PLoS ONE*, 2012.

- [43] N. Bourgeois, L. Lachaud, J. Reynes, I. Rouanet, A. Mahamat, A. P. Bastien, Long-Term Monitoring of Visceral Leishmaniasis in Patients with AIDS: Relapse Risk Factors, Value of Polymerase Chain Reaction, and Potential Impact on Secondary Prophylaxis. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, vol. 48, pp.13-19, 2008.
- [44] M. R. Pereira, F. Rocha-Silva, C. Graciele-Melo, C. R. Lafuente, T. Magalhães, R. B. Caligiorne, Comparison between conventional and real-time PCR assays for diagnosis of visceral leishmaniasis, Hindawi Publishing Corporation. *BioMed Research International*, vol. 2014, pp. 4, 2014.
- [45] G.A. Ferreira, F. C. Soares, R. A. Vasconcellos, E. H. Rodrigues, M. E. Werkhäuser, F. G. Abath, Discrimination of *Leishmania braziliensis* variants by kDNA signatures produced by LSSP-PCR, *Journal Parasitology*, vol. 93, pp.712-714, 2007.
- [46] J. S. Alvarenga, C. M. Ligeiro, S. Gontijo, L. Cortes, A. R. Campino, M. N. Vag, kDNA genetic signatures obtained by LSSP-PCR analysis of *Leishmania (Leishmania) infantum* isolated from the new and the old world, *PLoS One*, vol.7, e43363, 2012.
- [47] L. M. Winter-Floeter, Descrição e utilização de alvos moleculares para identificação de *Leishmania* por PCR. New molecular targets for PCR identification of *Leishmania*. Universidade de São Paulo, 2010.
- [49] M. Sudarshan, S. Sundar, Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 80, n. 1, p. 40–42, 2014.
- [50] M. Ceccarelli, L. Galluzzi, A. Migliazzo, L. Magnani, Detection and Characterization of *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* by SYBR Green- Based Real-Time PCR and High Resolution Melt Analysis Targeting Kinetoplast Minicircle DNA, *PLOS ONE*, vol. 9, no. 2, 2014.
- [51] I. Molina, R. Fisa, C. Riera, V. Falco, A. Elizalde, F. Salvador, M. Crespo, A. Curran, P. López-Chejade, S. Tebar, S. Pérez-Hoyos, S. Ribera, A. Pahissa, Ultrasensitive Real-Time PCR for the Clinical Management of Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected Patients, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 89, no. 1, pp. 105–110, 2013.

- [52] J. Chemli, M. Abroug, A. Fathallah, S. Abroug, M. Ben Said, A. Harbi, Apport de la leucoconcentration dans le diagnostic du kala-azar en Tunisie, *Medecine Et Maladies Infectieuses*, vol. 36, no. 7, pp. 390-392, 2006.
- [53] M.A Salam, M. G. Khan, K. Baskar, M. H. Afrad, M. M. Huda, D. Mondal, Peripheral blood buffy coat smear: a promising tool for diagnosis of visceral leishmaniasis, *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, no. 3, pp. 837-840, 2012.
- [54] J. C. Silva, D. A. Zacarias, V. C. Silva, N. Rolao, D. L. Costa, C. H. N. Costa, Comparison of optical microscopy and quantitative polymerase chain reaction for estimating parasitaemia in patients with kala-azar and modelling infectiousness to the vector *Lutzomyia longipalpis*, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 111, no. 8, pp. 517-522, 2016.
- [55] L. H. S. Marques, L. I. Gomes, I. C. M. da Rocha, T. A. M. da Silva, E. Oliveira, M. H. F. Moraes, A. Rabello, M. Carneiro, Low Parasite Load Estimated by qPCR in a Cohort of Children Living in Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis in Brazil, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 12, e1955, 2012.
- [56] B. P. Hurrell, S. Schuster, E. Grün, M. Coutaz, R. A. Williams, W. Held, B. Malissen, M. Malissen, S. Yousefi, H. U. Simon, A. J. Müller, F. Tacchini-Cottier, Rapid Sequestration of *Leishmania mexicana* by Neutrophils Contributes to the Development of Chronic Lesion, *PLOS Pathogens*, vol. 28, 2015.
- [57] N. Tiwari, V. Kumar, M. R. Gedda, A. K. Singh, V. K. Singh, S. Gannavaram, S. P. Singh, R. K. Sing, Identification and Characterization of miRNAs in Response to *Leishmania donovani* Infection: Delineation of Their Roles in Macrophage Dysfunction, *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, 2017.
- [58] S. Sundar, A. Shrinkhla, K. Pai, M. Chance, M. Hommel, Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex agglutination test, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 73, no. 2, pp. 269–271, 2005.
- [59] P. R. S. Ladeira, C. Isaac, M. C. Ferreira, Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real/ Real-time reverse transcription polymerase chain

reaction, *Revista Medica*, vol. 90, no. 1, pp.47-51, 2011.

- [60] F. Basiye, M. Mbuchi, C. Magiri, G. Kirigi, S. Deborggraeve, G. Schoone, et al., Sensitivity and specificity of the *Leishmania* Oligo C-Test and NASBA-oligochromatography for diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya, *Tropical Medicine & International Health*, vol. 15, no. 7, pp. 806–10, 2010.
- [61] C. Mugasa, T. Laurent, G. Schoon, F. Basiye, A. Saad, S. El Safi, et al., Simplified molecular detection of *Leishmania* parasites in various clinical samples from patients with leishmaniasis, *Parasitology and Vectors*, vol. 3, pp. 13, 2010.
- [62] S. Verma, K. Avishek, V. Sharma, N. Negi, V. Ramesh, P. Salotra, Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 75, no. 4, pp. 390–395, 2013.

## ANEXO III

Artigo submetido a revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

**Quantifying *HSP70* gene mRNA from *Leishmania infantum* in the blood of visceral leishmaniasis patients**

Eliamara B Sabino<sup>1</sup>, Vladimir C Silva<sup>1</sup>, Gabriel R Ferreira<sup>1</sup>, Dorcas L Costa<sup>1</sup>, Carlos HN Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Piauí, Department of Community Medicine, Natan Portella Institute for Tropical Diseases, Leishmaniasis Laboratory

*Visceral leishmaniasis (VL), or kala-azar, is caused by the protozoan species Leishmania donovani and L. infantum, which cause one of the deadliest tropical diseases. RNA transcripts have shown to be good biomarkers and offer a promising field for detecting viable parasites in biological samples. Due to its lability and rapid degradation, the amount of parasite RNA in the host's peripheral blood may indicate parasitemia and predict infectivity. This study describes the presence of L. infantum RNA in a quantitative PCR (qPCR) system. The PCR reactions were performed on blood samples from 79 patients with visceral leishmaniasis admitted to a referral hospital in Teresina, Brazil. RNA and DNA were extracted from buffy coat samples for further quantification. To amplify RNA after exposure to reverse transcriptase, a pair of HSP70 gene primers were used in a SYBR Green system. For DNA, a pair of kinetoplast DNA primers were used in a Taqman system. Non-parametric statistical tests were performed. The RNA and DNA were significantly correlated ( $p = 0.03$ ;  $\rho = 0.23$ ). The estimated median parasitemia for RNA was 32.5 parasites/mL, and for DNA, it was 1,380 parasites/mL. The estimated parasitemia was unassociated with age, gender, HIV infection, severity or death. Although promising, this technique must be validated for estimating parasitemia and eventually replacing xenodiagnosis to assess the infectivity of visceral leishmaniasis reservoirs.*

**Keywords:** kala-azar - visceral leishmaniasis - qPCR

Visceral leishmaniasis (VL), or kala-azar, is caused by the protozoan species *Leishmania donovani* and *L. infantum*. It is considered a reemerging disease, and the number of human cases has increased significantly. It is estimated that 0.4 million people are infected, with up to 40,000 deaths per year (Elmahallawy et al. 2014, Di Muccio et al. 2015, Dhingra et al. 2010). Despite the growing number of infected people worldwide, many cases are unreported (Jeronimo et al. 2004, Paiva-Cavalcanti et al. 2015).

Once the vertebrate host's skin is bitten by a transmitting sand fly and inoculated with saliva, the infective forms of the two viscerotropic species of *Leishmania* appear in the lymph nodes, spleen,

liver, skin and mucosal lining (Ikeda-Garcia and Marcondes 2007). Circulating or skin parasites are subsequently transmitted to the vectors (Costa 2011). Although dogs infect the most sand flies and are considered the main reservoirs in urban areas, humans are important sources of blood for the vector in urban areas and may be equally as important as dogs (Macedo-Silva et al. 2014). However, the vector's role in disease transmission remains unclear (Costa et al. 2000, Costa et al. 2005, Ferreira et al. 2017). Xenodiagnosis (exposure to a non-infected sand fly bite) is the gold standard for determining infectivity but has limitations, as it is a laborious and expensive test that requires trained personnel and adequate facilities for the insectary and is restricted by ethics committees (Chappuis et al. 2007, Solano-Gallego et al. 2009, Miller et al. 2014).

Thus, new strategies, such as molecular techniques, have been adopted to identify the presence of viable parasites in the blood and to determine infectivity (Miller et al., 2014, Seblova et al, 2013, Kirstein et al. 2017). Recently, Ferreira et al. (2017) demonstrated that xenodiagnosis and the amount of circulating parasite DNA are correlated. In addition, Silva et al. (2016) reported that quantifying parasite DNA, when compared to microscopy, is overestimated and fails to demonstrate the presence of viable circulating parasites.

Studies on circulating RNA have shown this to be an emerging field for non-invasive diagnosis due to RNA's labile nature, its presence in biological fluids and its cellular transcriptional activity (Marques et al. 2012). RNA transcripts can also be used as biomarkers (Pellegrini et al 2015, Xu et al 2016, Imamura et al 2016); therefore, this study explored quantifying mRNA from a single-copy *L. infantum* gene in the buffy coat from the blood of VL patients, to assess its potential in studying human *L. infantum* transmission.

## MATERIALS AND METHODS

*Study population* - The sample consisted of 79 patients treated at the "Natan Portella" Institute for Tropical Diseases (IDTNP). Patients were eligible if they presented with fever and hepatosplenomegaly and were diagnosed with VL confirmed by serology, direct examination, bone marrow culturing, and polymerase chain reaction (PCR). Clinical data were collected from patient records. Patients were included after signing a consent form. The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Piauí (UFPI) (40374714.8.0000.5214).

*DNA extraction* - DNA was extracted from 200 µL of blood using the Pure Link DNA mini kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) per the manufacturer's instructions. The DNA concentration and purity were measured with a spectrophotometer (NanoDrop™ 2000 Thermo Scientific Inc. Wilmington, DE) using 260-nm and 280-nm wavelengths, and the samples were adjusted to a final concentration of 10 ng/µL for the qPCR reaction.



*RNA extraction and cDNA library assembly* - Blood was centrifuged (3000 rpm for 5 min), and 800  $\mu\text{L}$  of buffy coat was separated and transferred to a tube containing 1200  $\mu\text{L}$  of RNAlater (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until RNA extraction. For the RNA extraction, 1000  $\mu\text{L}$  of the preserved sample was used, using the SV Total RNA Isolation System kit (Promega, Madison, WI, USA) per the manufacturer's protocol. Subsequently, cDNA libraries were constructed using the High Capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). The RNA and cDNA concentration and purity were measured in a NanoDrop™ 2000 at 260 and 280-nm wavelengths. The cDNA was diluted to a final concentration of 200 ng/ $\mu\text{L}$  for the quantification reactions.

*Constructing the standard curve* - One isolate (MHOM/BR/2016/5745) of *L. infantum* (50  $\mu\text{L}$ ), obtained from a patient from Teresina who was treated and cured, was inoculated in 1 mL of NNN (Novy-McNeal-Nicolle) medium and Schneider's medium (Schneider's Insect Medium, Sigma, St. Louis, MO, USA). The culture was incubated for five days at  $27^{\circ}\text{C}$  under standard pressure conditions. On the fifth day, the parasites were counted in a Neubauer chamber. To extract the DNA and RNA,  $5 \times 10^6$  parasites were centrifuged at 1200 g for 10 min. After centrifugation, the pellet was washed three times in RPMI solution and washed once in 200  $\mu\text{L}$  of sterile saline. To generate a standard curve, DNA samples were adjusted to an equivalent of  $2.5 \times 10^4$  parasites/mL in pure water, followed by serial dilutions ( $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$ , and  $10^{-1}$ ).

*qPCR DNA* - *L. infantum* was detected and quantified through a series of qPCR reactions using hydrolysis probe technology (Taqman®), as described by Rolão et al. (2004). Oligonucleotides and probes were designed based on the minicycle DNA sequence of kinetoplast (kDNA) from isolated *L. m. infantum* (MHOM/BR/2016/5745). The detection sequences used were Linf kDNA-R 5'-GGCGTTCTGCAAAAATCGGAAAA-3', Linf kDNA-R 5'-CCGATTTTTGGCATTTTTGGTCGAT-3', and Linf kDNA\_FAM-5'-TTTGAACGGGATTTCTG-3' (AF GenBank accession number 169140). The reactions were performed in a final volume of 20  $\mu\text{L}$ , including 4  $\mu\text{L}$  of DNA sample (10 ng), 0.5  $\mu\text{L}$  of customized probes (2.5 pmol) and primer (10 pmol) (Custom TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems), 10  $\mu\text{L}$  of 1x master mix (TaqMan® Gene Expression Assays Master Mix, Applied Biosystems) and 5.5  $\mu\text{L}$  of ultrapure sterile water, in 96-well plates using the Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems). After initial denaturation for 10 min at  $95^{\circ}\text{C}$ , the samples were subjected to 40 cycles of amplification consisting of two steps: 15 sec at  $95^{\circ}\text{C}$  and 1 min at  $60^{\circ}\text{C}$ . The standard curve was constructed in duplicate, and two negative controls composed of the reaction mixture with water instead of the DNA sample were added to each plate.

*qRT-PCR* - To determine viable parasites in the peripheral blood, the cDNA was amplified using sense and antisense primers (FAGAGGTGCAGTCCCTCGTGT and R CCTCCGTCTGCTTGCTCTTG) for

protein HSP70, generating a 137-bp fragment (Sudarshan, Sundar 2014). The qPCR was adapted per Ghosh et al. (2015) and Ribeiro-Romão (2016) for the above gene and performed on a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using SYBR Green Chemistry (Promega). Amplification conditions were one cycle at 95°C for 3 min, 40 cycles of 95°C for 15 sec (denaturation), 58°C for 30 sec (annealing) and 72°C for 30 sec (extension). The fluorescence signal was captured at the end of each cycle using the SYBR channel (excitation of a 490-nm wavelength and emission of 525 nm). HSP70 was used as the reference gene.

*Statistical analysis* - All data were imported from a spreadsheet in Microsoft Excel 2003®, and statistical analysis was performed using Stata/SE® 10.0 for Windows (College Station, Texas, USA). The means and 95% confidence intervals (95% CI) of non-normally distributed variables, as well as the medians, were calculated. The Spearman test was applied to assess the correlation between the qPCR parasitemia estimates.

## RESULTS

*Study population* - mRNA and kDNA of parasites from 79 patients were quantified. Of these, 18 were female (23%) and 61 were male (77%). Ages ranged from one to 83 years of age with a mean of 34 years of age (95% CI: 30, 38). Eight (10.1%) were younger than or equal to five years old, three (3.8%) were aged between five and 15 years, 39 (49.4%) were between 16 and 40 years old and 29 (36.7%) were older than 40 years. Twenty (29%) were coinfecting with the HIV virus. Only three (3.8%) adult males died (Table 1). Some had clinical features related to disease severity, such as bleeding, dyspnea, jaundice, vomiting, edema, and bacterial infection.

*Constructing the standard curve* - The qPCR reaction sensitivity was tested using serial dilutions of DNA and cDNA from the cultured parasite (*L. infantum*). This sensitivity allowed a detection limit of 0.1 parasites/mL of blood. The standard curve of the culture-extracted DNA showed good efficiency (Slope: 3.352,  $r^2$ : 0.999, efficiency: 98.74) (Fig. 1). The extracted RNA also showed good efficiency (Slope: -3.387,  $r^2$ : 0.999, efficiency: 97.35) (Fig. 2).

*Quantifying parasitemia by qPCR* - The median RNA parasitemia level was 32.5 parasites/mL, while for DNA, it was 1380 parasites/mL. Parasite numbers were significantly increased in the DNA compared with the RNA, which were positively correlated ( $p = 0.03$ ; Rho 0:23) (Fig. 3). From the median, both parasitemia levels were not useful for predicting mortality, as no correlation existed between the number of HIV-infected parasites/mL, outcome and disease severity. For the probability of death, the non-severe group ( $\leq 10$ ) had 130 parasites/mL for the RNA and 1,1621.4 parasites/mL for the DNA. For the severe group ( $> 10$ ), the RNA had 359 parasites/mL, and the DNA had 5887.7

parasites/mL. The probability of death between the severe and non-severe groups did not significantly differ.

## DISCUSSION

In contrast to the source population, most of the study population were adults, (Zacarias et al. 2017, Albuquerque et al. 2009), as analyzing small children was avoided due to the volume of blood required. However, as the median parasitemia levels among genders, ages, HIV infection status and disease severity did not significantly differ, it is possible that the age distribution did not impact the estimated parasitemia level distribution in the target population.

Directly identifying *Leishmania sp.* amastigotes would be the gold standard for diagnosing infection by these parasites (Silva et al 2005); however, parasitological diagnosis can have insufficient sensitivity. Thus, diagnostic systems based on nucleic acid amplification were developed to identify active infections (Wilson 1995, Nicolas et al. 2002, Ikonopoulou et al. 2003, Mary et al. 2004, van der Meide et al. 2008, Solano-Gallego et al. 2015).

Quantifying circulating messenger RNA is a promising diagnostic field because as this molecule has high intracellular levels, its presence indicates current metabolic activity and cell vitality (Sharova et al. 2009, Kumarswamy et al. 2014, Xu et al. 2016). Therefore, the amount of messenger RNA is associated with living cell presence (Spornraft et al. 2014, Spornraft et al. 2015). Studying the estimated amastigote levels in the blood, as indicated by qPCR of cDNA from mRNA (van der Meide et al. 2008), indicates the number of circulating parasites and thus could provide valuable information on the general factors associated with parasitemia and infectivity.

The significantly higher number of parasites obtained through qPCR of kDNA relative to that estimated through mRNA shows the distinct nature of the measurements, since while estimating DNA measures both circulating parasites and dead parasites in the tissue, mRNA estimation is likely restricted to only circulating, live parasites (van der Meide et al. 2008 Sharova et al. 2009, Padmanabhan et al. 2012, Silva et al. 2016). Despite this substantial difference, mRNA and kDNA were positively correlated, demonstrating that higher total parasite loads meant more circulating amastigotes.

In total, 32.5 parasites/mL were detected, much higher than the 0.3 parasites/mL that Silva et al. (2016) found by microscopy and higher than other reports of low parasitemia levels, also measured by hemoconcentration (Chemli et al. 2006, Salam et al. 2012). Due to RNA's lability, which can last from minutes to hours in the extracellular medium (Ross, Kobs 1986), the quantified levels are assumed to be higher than the number of parasites measured by microscopy. This is due to possible mRNA contamination by cells that recently died in the tissues, although the levels are much lower than those obtained through DNA quantification. Despite this, mRNA quantification seems to be the most accurate method for estimating circulating live parasite numbers.

This study is the first to demonstrate the presence of parasite mRNA in blood from visceral leishmaniasis patients. The qRT-PCR system may soon become a reference for quantifying viable parasites. This strategy must be validated by directly comparing the circulating parasite counts measured by microscopy. In addition, it is a promising, less biased estimate of infectivity than that obtained by qPCR.

#### REFERENCES

- Albuquerque PL, Silva Junior GB, Freire CC, Oliveira SB, Almeida DM, Silva HF. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceara, Brazil. *Rev Panam Salud Publica*. 2009; 26(4): 330-333.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling R. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*. 2007, 5(11): 873-882.
- Chemli J, Abroug M, Fathallah A, Abroug S, Ben Said M, Harbi A. Apport de la leucoconcentration dans le diagnostic du kala-azar en Tunisie. *Med Mal Infect*. 2006; 36(7): 390-392.
- Costa CH, Gomes RB, Silva MR, Garcez LM, Ramos PK, Santos RS, Shaw JJ, David JR, Maguire JH. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *J Infect Dis*. 2000; 182: 997–1000.
- Costa CHN, Werneck GL, Rodrigues L, Santos MV, Araújo IB, Moura LS, Moreira S, Gomes RBB, Lima SS. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2005; 99: 229–236.
- Costa, CHN. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev Soc Bras MedTrop* 2011, 44(2): 232-242.
- Di Muccio T, Scalone A, Bruno A, Maragi M, Grande R. Correction: Epidemiology of imported Leishmaniasis in Italy: Implications for a European Endemic Country. *PLoS ONE*. 2015; 10(7).
- Dhingra KK, Gupta P, Saroha V, Setia N, Khurana N, Singh T. Morphological findings in bone marrow biopsy and aspirate smears of visceral Kala Azar: a review. *Indian J Pathol Microbiol*. 2010; 53(1): 96-100.
- Elmahallawy E, Martinez AS, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Mari, JMN. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*. 2014; 8(8) : 961–972.
- Ferreira GR, Castelo Branco Ribeiro JC, Meneses Filho A, de Jesus Cardoso Farias Pereira T, Parente DM, Pereira HF, Carlos da Silva J, Zacarias DA, Vieira da Silva L, Medeiros Faustino

- SK, Almeida Neto WS, Costa DL, Lopes de Mendonça I, Nery Costa CH. Human Competence to Transmit *Leishmania infantum* to *Lutzomyia longipalpis* and the Influence of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2017; 98(1):126-133.
- Imamura T, Komatsu S, Ichikawa D, Kawaguchi T, Miyamae M, Okajima W, Ohashi T, Arita T, Konishi H, Shiozaki A, Morimura R, Ikoma H, Okamoto K, Otsuji E. Liquid biopsy in patients with pancreatic cancer: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. *World J Gastroenterol.* 2016, 22(25): 5627-5641.
- Ikeda-Garcia FA, Marcondes M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Rev Clin Vet.* 2007, 12(71): 34-42.
- Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the propose assay on clinical samples. *Veterin Parasitol.* 2003; 113: 99-113.
- Ghosh AK, Sardar AH, Mandal A, Saini S, Abhishek K, Kumar A, Purkait B, Singh R, Das S, Mukhopadhyay R, Roy S, Das P. Metabolic reconfiguration of the central glucose metabolism: a crucial strategy of *Leishmania donovani* for its survival during oxidative stress. *FASEB J.* 2015; 29(5): 2081-2098.
- Jeronimo SMB, Duggal P, Braz RFS, Cheng C, Monteiro GRG, Nascimento ET. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Scand J Infect Dis.* 2004; 36 : 443-449.
- Kirstein OD, Abbasi I, Horwitz BZ, Skrip L, Hailu A, Jaffe C, Li LL, Prow TW, Warburg A. Minimally invasive microbiopsies: a novel sampling method for identifying asymptomatic, potentially infectious carriers of *Leishmania donovani*. *Int J Parasitol.* 2017, 47: 609-616.
- Kumarswamy R, Bauters C, Volkmann I, Maury F, Fetisch J, Holzmann A, Lemesle G, de Groote P, Pinet F, Thum T. Circulating Long Noncoding RNA, LIPCAR, Predicts Survival in Patients With Heart Failure. *Circ Res.* 2014, 9(114): 1569:1575.
- Macedo-Silva VP, Martins DRA, De Queiroz PVS, Pinheiro MPG, Freire CCM, Queiroz JW, Dupnik KM, Pearson RD, Wilson ME, Jeronimo SMB, Ximenes MF. Feeding preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the sand fly vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *J Med Entomol.* 2014; 51: 237–244.
- Marques LHS, Gomes LI, da Rocha ICM, da Silva TAM, Oliveira E, Morais MHF, Rabello A, Carneiro M. Low Parasite Load Estimated by qPCR in a Cohort of Children Living in Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLOS Negl Trop Dis.* 2012; 6(12): e1955.

- Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (11): 5249-5255.
- Miller E, Warburg A, Novikov I, Hailu A, Volf P, Seblova V, Huppert A. Quantifying the contribution of hosts with different parasite concentrations to the transmission of visceral leishmaniasis in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8: e3288.
- Nicolas LE, Prina T, Lang T, Milon. Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1666-1669.
- Padmanabhan PK, Samant M, Cloutier S, Simard MJ, Papadopoulou B. Apoptosis-like programmed cell death induces antisense ribosomal RNA (rRNA) fragmentation and rRNA degradation in *Leishmania*. *Cell Death Differ.* 2012; 19: 972–982.
- Paiva-Cavalcanti M, Morais RCS, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, Goncalves-de-Albuquerque SC, Tavares DHC. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci.* 2015; 5: 31.
- Pellegrini KL, Sandaa MG, Moreno CS. RNA Biomarkers to Facilitate the Identification of Aggressive Prostate Cancer. *Mol Aspects Med.* 2015, 45: 37-46.
- Ribeiro-Romão RP, Saavedra AF, Da-Cruz AM, Pinto EF, Moreira OC. Development of real-time PCR assays for evaluation of immune response and parasite load in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasit Vectors.* 2016; 9: 361.
- Rolão N, Cortes S, Rodrigue OR, Campino L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Parasitol.* 2004; 90(5) :1150-1154.
- Ross J, Kobs G. H4 histone messenger RNA decay in cell-free extracts initiates at or near the 3' terminus and proceeds 3' to 5'. *J Mol Biol.* 1986, 188(4): 579-593.
- Salam MA, Khan MG, Baskar K, Afrad MH, Huda MM, Mondal D. Peripheral blood buffy coat smear: a promising tool for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(3) :837-840.
- Seblova V, Volfova V, Dvorak V, Pruzinova K, Votypka J, Kassahun A, Gebre-Michael T, Hailu A, Warburg A, Volf P. *Phlebotomus orientalis* sand flies from two geographically distant Ethiopian localities: biology, genetic analyses and susceptibility to *Leishmania donovani*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013, 7: 1–8.

- Silva JC, Zacarias DA, Silva VC, Rolao N, Costa DL, Costa CHN. Comparison of optical microscopy and quantitative polymerase chain reaction for estimating parasitaemia in patients with kala-azar and modelling infectiousness to the vector *Lutzomyia longipalpis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016; 111(8) :517-522.
- Silva MRB, Stewart JM, Costa CHN. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2005, 72(6): 811-814.
- Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol*. 2015; 39 : 560-63.
- Sharova LV, Sharov AA, Nedorezov T, Piao Y, Shaik N, Ko MS. Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res*. 2009; 16(1) :45-58.
- Spornraft M, Kirchner B, Haase B, Benes V, Pfaffl MW, Riedmaier I. Optimization of extraction of circulating RNAs from plasma enabling small RNA sequencing. *PLoS One*. 2014; 17(9) :e107259.
- Spornraft M, Benedikt K, Pfaffl MW, Irmgard R. The potential of circulating extracellular small RNAs (smexRNA) in veterinary diagnostics—Identifying biomarker signatures by multivariate data analysis. *Biomol Detect Quantif*. 2015; 5 :15–22.
- Sudarshan M, Sundar S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian Visceral Leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014; 80(1) : 40–42.
- Van der Meide W, Guerra J, Schoone G, Farenhorst M, Coelho L, Faber W, Peekel I, Schallig H. Comparison between Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, Real-Time Reverse Transcriptase PCR, and Real-Time PCR for Quantification of *Leishmania* Parasites. *J Clin Microbiol*. 2008: 73-78.
- Wilson SM. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: Fields applications and practicalities. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1995; 89(1): 95-100.
- Xu MJ, Dorsey JF, Vadi RA, Karahousis J, Simone II CB, Xu X, Xu W, Carpenter EL, Schuchter L, Kao GD. Circulating Tumor Cells, DNA, and mRNA: Potential for Clinical Utility in Patients With Melanoma. *The Oncologist*. 2016, (21): 84-94.

Zacarias DA, Rolão N, de Pinho FA, Sene I, Silva JC, Pereira TC, Costa DL, Costa CHN. Causes and consequences of higher *Leishmania infantum* burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients. *Trop Med Int Health*. 2017; 22(6) :679-687



TABEL I

Characterization of the study population of patients with new world kala-azar, from Teresina, Brazil

Features		Number (%)
Age (Year)	$\leq 5$	08 (10.12)
	$5 \leq 15$	03 (3.80)
	$15 \leq 40$	39 (49.37)
	$> 40$	29 (36.71)
Gender	Female	18 (23)
	Male	61 (77)
HIV infection	Positive	20 (29)
	Negative	49 (61)
Death indicator	$\leq 10$	48 (60.8)
	$\geq 10$	11 (13.9)
Mortality	Survivor	76 (96.2)
	Died	03 (3.8)
Total		79

TABEL II

DNA and cDNA quantification of peripheral blood parasites from patients for the kDNA and HSP70 targets

Feature	Patients number	kDNA quantification		cDNA Quantification	
		Mean (P/ $\mu$ L)	Median (P <sup>2</sup> / $\mu$ L)	Mean (P/ $\mu$ L)	Median (P <sup>2</sup> / $\mu$ L)
Age (Year)					
$\leq 5$	08	3833,33	720	20,5 <sup>1</sup>	0
$5 \leq 15$	03	22301,67	6470	1.200	205
$15 \leq 40$	39	9619,34	6400	162,92 <sup>1</sup>	65
$> 40$	29	10215,6	6470	192,32 <sup>1</sup>	30
Gender					
Female	18	16655,6	2357,5	198,28	0
Male	61	7543,11	1315	230,79 <sup>1</sup>	27,5
HIV infection					
Positive	20	6478,25	2237,5	254,86	72,5
Negative	48	12383,17	2322,5	190,69	32,5
Mortality					
Survivor	76	9715,82	1360	227,33	32,5
Died	03	7900	10505	145	0
Death indicator					
$\leq 10$	48	11621,4	2215	129,9	32,5
$\geq 10$	11	5887,7	3160	359,4	0

<sup>1</sup> Parasite equivalent per mL (p <0.05) by Mann-Whitney technique.

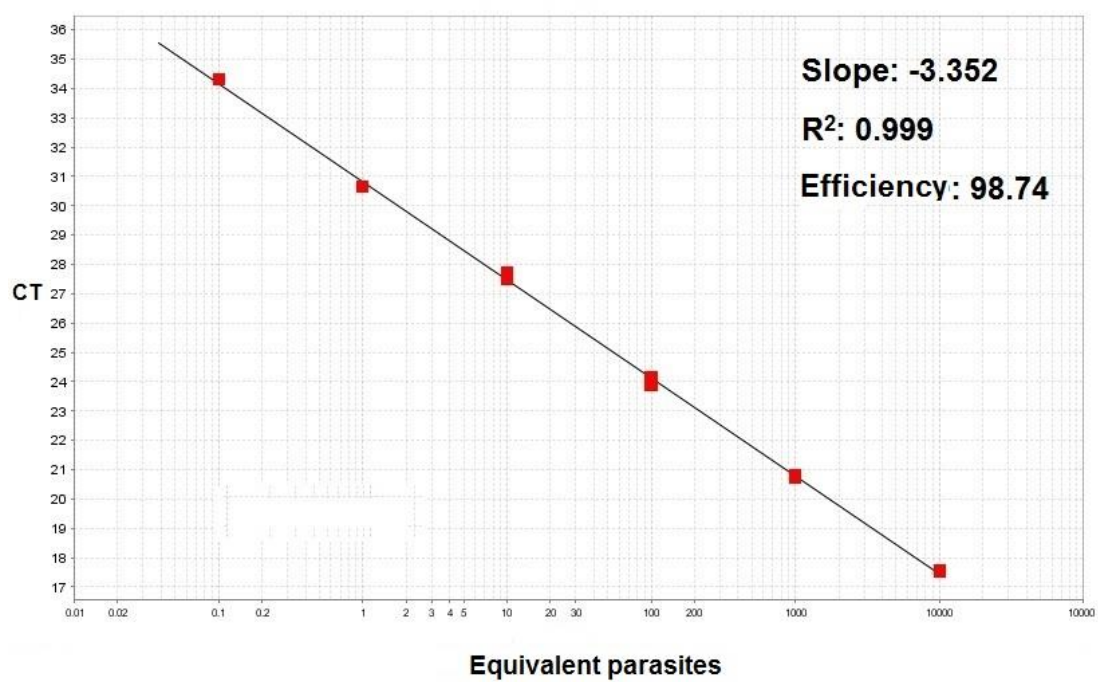


Fig. 1: Standard curve obtained for total quantification of DNA, using TaqMan probe for kDNA. Each point is given by fluorescence mean of the samples in triplicate for standard curve. Slope: -3,352. R<sup>2</sup>: 0.999. Efficiency: 98.74.

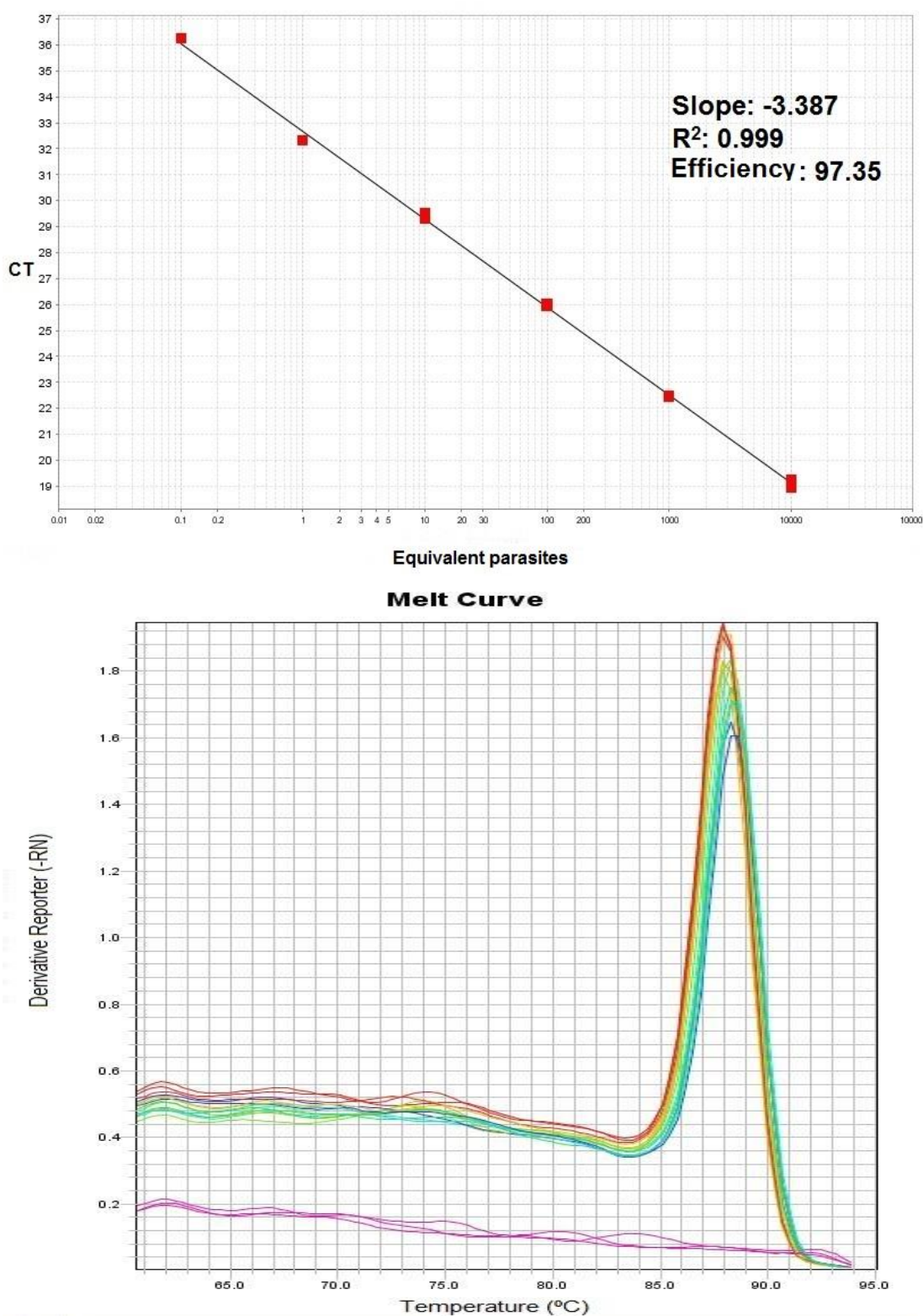


Fig. 2: Standard curve example obtained for total quantification of cDNA using SYBR green for HSP70. Each point is given by fluorescence mean of the samples in triplicate for standard curve. Slope: -3.387. R<sup>2</sup>: 0.999. Efficiency: 97.35. T<sub>m</sub>: 88.6.

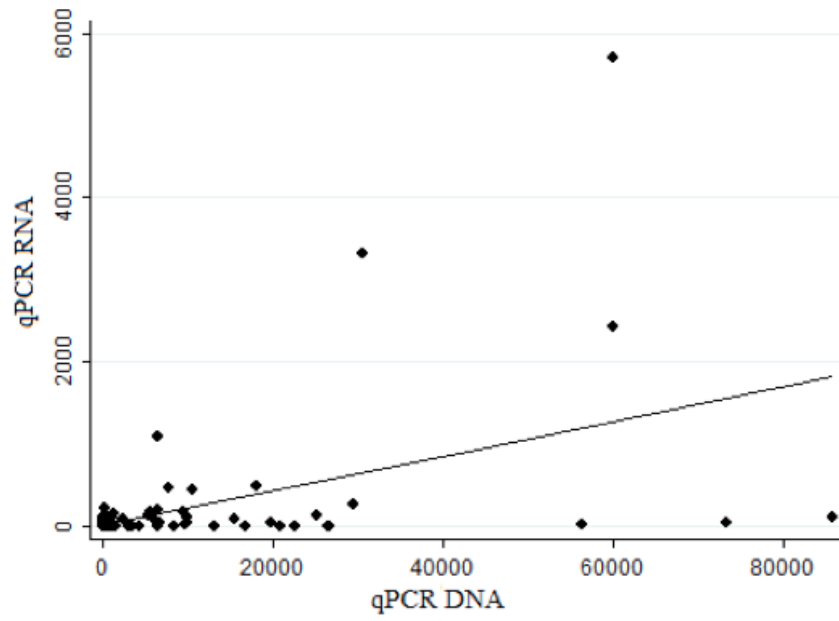


Fig. 3: Correlation between both estimates with  $r = 0.23$  and p-value: 0.03.