



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

**Desenvolvimento e validação de kit diagnóstico NAT utilizando PCR
em tempo real para detecção de parasitas protozoários**

Thainá de Melo Lessa Amorim
Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima

Brasília
2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

**Desenvolvimento e validação de kit diagnóstico NAT utilizando PCR
em tempo real para detecção de parasitas protozoários**

Thainá de Melo Lessa Amorim
Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima

**Dissertação apresentada como
requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em Biologia
Microbiana da Universidade de
Brasília.**

Brasília
2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

**Desenvolvimento e validação de kit diagnóstico NAT utilizando PCR
em tempo real para detecção de parasitas protozoários**

Dissertação aprovada em 23 de fevereiro de 2018 pela banca examinadora:

Profa. Doutora Beatriz Dolabela de Lima (Presidente)

Universidade de Brasília/Instituto de Ciências Biológicas/Departamento de Biologia Celular

Profa. Doutora Izabela Marques Dourado Bastos Charneau (Membro 1)

Universidade de Brasília/Instituto de Ciências Biológicas/Departamento de Biologia Celular

Profa. Doutora Tatiana Amabile de Campos (Membro 2)

Universidade de Brasília/Instituto de Ciências Biológicas/Departamento de Biologia Celular

Brasília

2018

Dedico esta dissertação em memória de minha amada mãe Maria de Lourdes Melo Amorim, que sempre estará comigo onde quer que eu vá, e ao meu pai Emerson e minha irmã Tathiana pelo apoio, compreensão e carinho durante toda esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, todas as conquistas e vitórias alcançadas em minha vida são para honra e glória do Senhor.

Agradeço à minha orientadora professora Doutora Beatriz Dolabela de Lima, pela paciência, compreensão e pelos preciosos ensinamentos, que com certeza foram fundamentais para a concretização deste trabalho tão sonhado. Sua experiência e sabedoria admiráveis me fortaleceram nos momentos em que nem eu mesma acreditava que seria capaz, portanto, muito obrigada pela oportunidade e pela confiança em mim depositada.

Agradeço de forma especial ao Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior, por sua disponibilidade e paciência para me ensinar quase tudo o que hoje sei com relação aos principais experimentos, sua ajuda foi de importância crucial para que esta dissertação pudesse ser concluída. Desejo-lhe muito sucesso e espero que um dia seja retribuído da melhor maneira possível por todo o bem que proporcionou a mim e a todos aos quais ajudou.

Gostaria de expressar também minha gratidão a toda a equipe do Laboratório da Biologia do Gene do Departamento de Biologia Celular da UnB, principalmente Agnelo Rodrigues, Fabiana Araújo, Juliana Name e Bianca Vasconcelos por todo o auxílio que prestaram a mim durante a realização das atividades, muito obrigada pela compreensão de todos.

Agradeço à equipe do Laboratório de Sorologia e de Imunohematologia de Doadores da Fundação Hemocentro de Brasília, por terem me auxiliado na obtenção das amostras para a realização dos testes, e a todos os que de forma direta ou indireta contribuíram para que fosse possível a concretização deste trabalho.

À Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS) pela concessão de apoio financeiro (Processo no. 064.000.560/2015, coordenador: Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior, Msc).

E agradeço sobretudo a meu pai Emerson Lessa Amorim e minha irmã Tathiana de Melo Lessa Amorim, pelo apoio incondicional nos bons e maus momentos e pelo amor a mim dedicados, que Deus os abençoe e proteja sempre.

RESUMO

O teste de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) é baseado na PCR em tempo real (qPCR), sendo atualmente utilizado na triagem de doadores em bancos de sangue, para detectar a presença do material genético dos vírus HIV, HBV e HCV em bolsas destinadas à doação. Este teste é mais sensível do que as técnicas sorológicas, por ser capaz de detectar a infecção na fase aguda antes do aparecimento de anticorpos, reduzindo o período de janela imunológica. Até o momento, nenhum teste NAT foi desenvolvido para a pesquisa de patógenos protozoários e a transmissão de doenças parasitárias via transfusão sanguínea e transplante de órgãos aumentou nos últimos anos. Neste trabalho, desenvolvemos um teste de diagnóstico NAT utilizando qPCR *Sybr Green* e *TaqMan* para a pesquisa do DNA de protozoários de alta relevância clínica, transmissíveis via transfusão sanguínea e endêmicos no Brasil, como o *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, *Leishmania spp.*, causadoras das leishmanioses, *Toxoplasma gondii*, causador da Toxoplasmose, e *Plasmodium spp.*, causadores da malária. Para tanto, foram utilizados pares de primers específicos para amplificação de genes conservados de cada um destes patógenos. Com relação aos testes de eficiência dos pares de primers utilizados, não houve perda de linearidade, pois os declives se mantiveram próximos de 100%. A sensibilidade para detecção de *T. cruzi*, *Leishmania sp.* e *Plasmodium sp.* foi semelhante na qPCR *Sybr Green* e *TaqMan*, para *T. gondii*, a qPCR *TaqMan* foi mais sensível, detectando um limite de 0,005 parasitas/ μ L. Constatamos que com relação à linearidade e sensibilidade ambas as metodologias são similares e com relação à especificidade, a *TaqMan* qPCR que utiliza sondas fluorogênicas gene-específicas marcadas com fluoróforos diferentes, apresentou-se superior ao *Sybr Green* qPCR, possibilitando a definição do tipo de protozoário presente na amostra a ser analisada. Deste modo, propomos o sistema de qPCR *Sybr Green* utilizando primers com alvo no rRNA 28S de Trypanosomatidae para a amplificação dos genes de *T. cruzi* e *Leishmania sp.* e com alvo no rRNA 18S para os genes de *Plasmodium sp.* e *T. gondii*. para ser utilizado nos testes de triagem. Em uma segunda etapa, o sistema qPCR *TaqMan* deve ser então utilizado nos testes confirmatórios. Deste modo, o estabelecimento deste teste diagnóstico na rotina de bancos de sangue contribuirá fortemente para o aumento da segurança transfusional.

Palavras-chave: NAT, doação de sangue, Doença de Chagas, Leishmaniose, Malária, Toxoplasmose.

ABSTRACT

The nucleic acid amplification test (NAT) is based on real-time PCR (qPCR) and is currently used in blood donor screening to detect the presence of the genetic material of HIV, HBV and HCV viruses in donated pockets. This test is more sensitive than serologic techniques, because it is able to detect acute infection before the appearance of antibodies, reducing the period of immunological window. To date, no NAT test has been developed for protozoan pathogen research, and transmission of parasitic diseases via blood transfusion and organ transplantation has increased in recent years. In this work, we developed a NAT diagnostic test using qPCR Sybr Green and TaqMan to investigate the DNA of protozoa of high clinical relevance, transmissible through blood transfusion and endemic in Brazil, such as *Trypanosoma cruzi*, which causes Chagas disease, *Leishmania* spp. , causing the leishmaniasis, *Toxoplasma gondii*, causative of toxoplasmosis, and *Plasmodium* spp., causing malaria. For this, specific pairs of primers were used for the amplification of conserved genes of each of these pathogens. Regarding the efficiency tests of the pairs of primers used, there was no loss of linearity, since the slopes remained close to 100%. The sensitivity for detection of *T. cruzi*, *Leishmania* sp. and *Plasmodium* sp. was similar in qPCR Sybr Green and *TaqMan*, for *T. gondii*, qPCR *TaqMan* was more sensitive, detecting a limit of 0.005 parasites / μ L. We found that with regard to linearity and sensitivity both methodologies are similar and with respect to specificity, *TaqMan* qPCR that uses gene-specific fluorogenic probes labeled with different fluorophores, was superior to Sybr Green qPCR, allowing the definition of protozoan type present in the sample to be analyzed. Thus, we propose the Sybr Green qPCR system using target primers in the Trypanosomatidae 28S rRNA for the amplification of the *T. cruzi* and *Leishmania* sp. and targeted at the 18S rRNA for the *Plasmodium* sp genes and *T. gondii* to be used in the screening tests. In a second step, the *TaqMan* qPCR system should be used in the confirmatory tests. In this way, the establishment of this diagnostic test in routine blood banks will contribute greatly to the increase of transfusion safety.

Key words: NAT, blood donation, Chagas disease, Leishmaniasis, Malaria, Toxoplasmosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP3: aminoácido permease 3

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

C_T: ciclo de *threshold*

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DTUs: do inglês: *discrete typing units*

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio imunossorvente ligado à enzima)

et al.: e outros (as)

FAM: 6-carboxifluoresceína

FRET: transferência energética ressonante fluorescente

HBV: *hepatitis B virus* (vírus da hepatite B)

HCV: *hepatitis C virus* (vírus da hepatite C)

HEX: fosforamidita

HIV: *human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

HRM: *high resolution melting* (curva de *melting* de alta resolução)

HSP70: proteína de choque térmico 70

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

ITS: *internal transcribed spacer* (espaçador do transcrito interno)

kDNA: ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto

L.: *Leishmania*

LIT: do inglês: *liver infusion tryptose*

NAT: *nucleic acid amplification test* (teste de amplificação de ácidos nucleicos)

NCBI: National Centre for Biotechnology Information

P.: *Plasmodium*

pb: pares de bases

PBS: *phosphate buffered saline* (tampão fosfato-salino)

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PCR-RFLP: reação em cadeia da polimerase por polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição

qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

ROX: 6-carboxi-X-rodamina

rRNA: ácido ribonucleico ribossomal

RT-PCR: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

S: unidade Svedberg

sp.: espécie

spp.: espécies

T. gondii: *Toxoplasma gondii*

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

TAMRA: tetrametilrodamina

Taq: *Thermus aquaticus*

TBE: Tampão Tris/Borato/EDTA

TE: tampão Tris/EDTA

TET: tetraclorofluoresceína

T_M : temperatura de *melting* (temperatura de associação)

V.: *Viannia*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Doença de Chagas.....	2
1.2 Leishmaniose.....	6
1.3 Malária.....	11
1.4 Toxoplasmose.....	15
1.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	18
1.6 Justificativa.....	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Geral.....	22
2.2 Específicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Estratégia experimental.....	23
3.2 Oligonucleotídeos para a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional.....	23
3.3 Oligonucleotídeos para a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real com <i>Sybr Green</i> e <i>TaqMan</i>	24
3.4 Cultivo celular das cepas de <i>T. cruzi</i>	26
3.5 Extração do DNA.....	27
3.6 PCR convencional.....	27
3.7 Estudo da eficiência da técnica de PCR em tempo real.....	28
3.8 Avaliação da sensibilidade dos primers e sondas.....	29
3.9 Avaliação da especificidade dos primers e sondas.....	30
4 RESULTADOS.....	33
4.1 PCR convencional.....	33
4.2 <i>Sybr Green</i> qPCR para detecção de <i>T. cruzi</i> e <i>Leishmania sp</i>	34
4.3 <i>Sybr Green</i> qPCR para detecção de <i>Plasmodium sp.</i> e <i>T. gondii</i>	43
4.4 <i>TaqMan</i> qPCR para detecção de <i>T. cruzi</i> e <i>Leishmania sp</i>	48
4.5 <i>TaqMan</i> qPCR para detecção de <i>Plasmodium sp.</i> e <i>T. gondii</i>	53
5 DISCUSSÃO.....	58
6 CONCLUSÃO.....	64
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
8 ANEXO A: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> em hospedeiros vertebrados e invertebrados.....	3
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Leishmania sp.</i> em hospedeiros vertebrados e invertebrados.....	8
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Plasmodium sp.</i> em hospedeiros primários e secundários.....	12
Figura 4: Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> em hospedeiros definitivos e intermediários.....	16
Figura 5. Etapas da qPCR em tempo real <i>TaqMan</i>	20
Figura 6. Estratégia experimental do teste NAT para detecção de parasitas protozoários.....	23
Figura 7. Análise dos produtos de amplificação da região intergênica do minixon das cepas G, CL Brener e Y de <i>T. cruzi</i> , realizada por PCR convencional em gel de agarose 2,5%.....	34
Figura 8. Teste de sensibilidade dos primers com alvo no gene do RNA ribossomal 28S de <i>Trypanosomatidae sp.</i>	35
Figura 9. Avaliação de especificidade dos primers com alvo no RNA ribossomal 28S de <i>Trypanosomatidae sp</i> utilizando DNA de <i>Leishmania sp</i>	37
Figura 10. Teste de eficiência e curva padrão dos primers com alvo no gene da sequência satélite do DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> e dos primers com alvo no gene da AAP3 de <i>Leishmania</i>	38
Figura 11. Teste de sensibilidade dos primers com alvo no gene da sequência satélite de <i>T. cruzi</i>	40
Figura 12. Teste de sensibilidade dos primers com alvo no gene da AAP3 de <i>Leishmania sp</i>	42
Figura 13. Teste de eficiência e curva padrão dos primers com alvo no gene do rRNA 18S de <i>Plasmodium sp.</i> e do gene B1 de <i>Toxoplasma gondii</i>	44
Figura 14. Teste de sensibilidade dos primers com alvo no gene do rRNA 18S de <i>Plasmodium sp.</i> e no gene B1 de <i>T. gondii</i>	45
Figura 15. Avaliação cruzada de especificidade dos primers com alvo no RNA ribossomal 18S de <i>Plasmodium sp</i> e no gene B1 de <i>T. gondii</i>	47
Figura 16. Teste de sensibilidade por PCR em tempo real <i>TaqMan</i> dos primers e sonda com alvo na sequência satélite do DNA de <i>T. cruzi</i>	49
Figura 17. Teste de sensibilidade por PCR em tempo real <i>TaqMan</i> dos primers e sonda com alvo no gene da AAP3 de <i>Leishmania sp.</i>	50
Figura 18. Avaliação de especificidade por teste multiplex utilizando a PCR em tempo real <i>TaqMan</i> com DNA de <i>T. cruzi</i> e <i>Leishmania sp</i>	51
Figura 19. Teste de sensibilidade por PCR em tempo real <i>TaqMan</i> dos primers e sonda com alvo no rRNA 18S de <i>Plasmodium sp.</i>	53
Figura 20. Teste de sensibilidade por PCR em tempo real <i>TaqMan</i> dos primers e sonda com alvo no gene B1 de <i>T. gondii</i>	54
Figura 21. Avaliação de especificidade por teste multiplex utilizando a PCR em tempo real <i>TaqMan</i> com DNA de <i>P. falciparum</i> e <i>T. gondii</i>	55
Figura 22: Esquema de aplicabilidade futura de testes de triagem e confirmatório por qPCR <i>Sybr Green</i> e <i>TaqMan</i> em bancos de sangue.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na PCR convencional para amplificação de uma porção específica do gene do miniéxon de <i>T. cruzi</i>	24
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na PCR em tempo real para amplificação dos genes de <i>T. cruzi</i> , <i>Leishmania sp.</i> , <i>Plasmodium sp.</i> e <i>Toxoplasma gondii</i>	25
Tabela 3. Sondas utilizadas na PCR em tempo real <i>TaqMan</i> para amplificação específica dos genes de <i>T. cruzi</i> , <i>Leishmania sp.</i> , <i>Plasmodium sp.</i> e <i>Toxoplasma gondii</i>	26
Tabela 4: Resumo dos resultados dos testes de eficiência por qPCR <i>Sybr Green</i> ..	56
Tabela 5: Resumo e comparação dos resultados de sensibilidade por qPCR <i>Sybr Green</i>	56
Tabela 6: Resumo e comparação dos resultados de sensibilidade por qPCR <i>TaqMan</i>	56
Tabela 7. Resumo dos resultados de especificidade por qPCR <i>Sybr Green</i> e <i>TaqMan</i>	57

1. INTRODUÇÃO

O risco de transmissão de infecções virais e infecções causadas por protozoários parasitas através de transfusão sanguínea é um sério problema de saúde pública. Para melhorar a qualidade de produtos derivados do sangue humano e obter maior segurança transfusional, testes sorológicos de triagem para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B (HBV), e vírus da hepatite C (HCV) são atualmente realizados nos hemocentros brasileiros para a seleção de candidatos à doação de sangue. Apesar de estes testes serem realizados a fim de reduzir ou até mesmo eliminar a transmissão destes vírus pela transfusão sanguínea, os riscos pós-transfusoriais ainda persistem. Isto se deve basicamente ao período de janela imunológica durante o qual as técnicas sorológicas são menos eficazes por não possuírem a capacidade de detectar os anticorpos nesta fase da infecção, uma vez que os mesmos podem estar abaixo do limite de detecção do teste, portanto, os testes sorológicos são pouco sensíveis para este fim.

Para solucionar este problema, é necessário o estabelecimento de estratégias diagnósticas moleculares de triagem mais sensíveis e específicas, como a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) que consiste na detecção e quantificação dos genomas dos microorganismos patogênicos. Esta técnica é muito mais sensível e diminui a obtenção de resultados falsos positivos devido a contaminações cruzadas (ASSIH et al., 2016). Para a triagem de doadores de sangue, um teste baseado na PCR em tempo real chamado teste de amplificação de ácidos nucleicos (*nucleic acid amplification test* - NAT) é utilizado para a detecção dos vírus HIV, HBV e HCV. Este teste foi implementado para a triagem de todos os doadores com sorologia negativa, o que permitiu avanços significativos na detecção de infecções transmitidas por transfusão sanguínea durante o período de janela imunológica, reduzindo drasticamente o risco de transmissão destes vírus aos receptores. (SULTAN et al., 2017). O teste NAT promove a redução do período de janela imunológica para HCV de 70 para 12 dias, para detecção de HIV, de 22 para 11 dias e para HBV este tempo é reduzido de 59 para 25 a 30 dias (CHIGURUPATI; MURTHY, 2015).

Doenças parasitárias como a Doença de Chagas, Leishmaniose, Malária e Toxoplasmose são protozoonoses de relevância clínica, por apresentarem altas taxas de morbi-mortalidade, serem endêmicas no Brasil, apresentarem formas assintomáticas e constituírem risco potencial de transmissibilidade por via transfusional de sangue

contaminado. Por isso, torna-se imperativo o uso de técnicas diagnósticas mais sensíveis para a detecção de protozoários parasitas em bolsas de sangue destinadas à transfusão sanguínea.

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma doença parasitária causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae). O agente etiológico, vetores e reservatórios da doença foram primeiramente descritos por Carlos Chagas em 1909 (REIS-CUNHA et al., 2015).

Esta doença representa um sério problema de saúde pública no Brasil e é caracterizada por diferentes padrões regionais. Além disso, esta doença produz impactos psicológicos, sociais e econômicos importantes, tendo sido classificada como doença tropical negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2013).

Os tripanossomatídeos possuem um ciclo de vida heteróximo, ou seja, são capazes de sobreviver tanto em hospedeiros vertebrados como invertebrados, além de possuírem como característica peculiar a capacidade de alterar sua forma durante o ciclo de vida (PECH-CANUL et al., 2017).

A transmissão clássica da infecção se dá através de insetos vetores da família Reduviidae e subfamília Triatominae. Estes vetores são hematófagos obrigatórios durante todo o seu ciclo de vida, realizando o repasto sanguíneo em animais de sangue quente e raramente em répteis e anfíbios. A disseminação da infecção acontece através da inoculação do parasita no local da picada através das excretas do inseto triatomíneo, como resultado da distensão de sua cavidade abdominal durante o repasto sanguíneo (BALOUZ et al., 2017).

Os insetos vetores ingerem as formas tripomastigotas circulantes na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, no estômago do inseto as tripomastigotas são lisadas e as que sobrevivem se transformam em esferomastigotas ou epimastigotas. No intestino do vetor, as epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas altamente infectantes, que são liberadas nas fezes e urina do inseto podendo infectar novos hospedeiros vertebrados (CARDOSO et al., 2016).

Dentro do hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas invadem fibroblastos, macrófagos e células epiteliais, levando à formação do vacúolo parasitóforo e diferenciação das formas tripomastigotas em amastigotas intracelulares

que se multiplicam por fissão binária e provocam a lise do vacúolo induzida por enzimas secretadas pelo parasita (CARDOSO et al., 2016). (Figura 1)

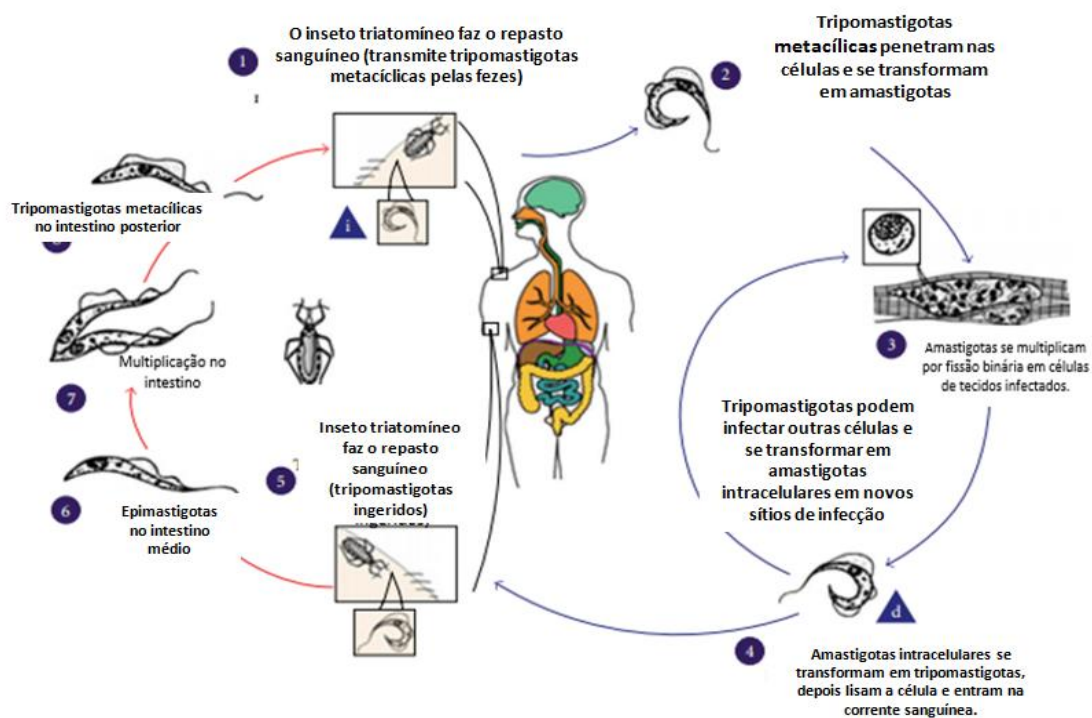


Figura 1: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros vertebrados e invertebrados. Imagem traduzida do Centro de Prevenção e Controle de Doenças disponível em <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

A doença de Chagas pode ocorrer em dois estágios diferentes, a fase aguda, que é caracterizada pela ausência de sintomas, sendo que a minoria dos pacientes apresenta manifestações clínicas inespecíficas; e a fase crônica, onde aparecem distúrbios cardíacos e gastrointestinais, no sistema nervoso central e disfunções endócrinas. A infecção aguda em um hospedeiro imunocompetente provoca uma reação de hipersensibilidade tardia no local de entrada das tripomastigotas na pele (chagoma) ou conjuntiva (injúria unilateral periorbital conhecida como sinal de Romanã). Existe também a fase crônica indeterminada, na qual os pacientes podem permanecer assintomáticos por toda a vida, com testes sorológicos para detecção de anticorpos IgG específicos (ABRAS et al. 2016).

A doença possui altas taxas de morbidade e mortalidade em países endêmicos, como o Brasil, e a sua distribuição geográfica está restrita principalmente ao continente americano. No entanto, a doença de Chagas tem atingido também países não-endêmicos, como resultado de um intenso processo de migração internacional (DIAS et al. 2016; SLAVOV, 2017).

A Organização Mundial de Saúde estima que aproximadamente 7 a 8 milhões de pessoas estão infectadas, sobretudo em países como Argentina, Brasil, México e Bolívia (WHO, 2015). No Brasil, 2 a 3 milhões de pessoas estão infectadas por *Trypanosoma cruzi* (FREITAS et al. 2017). Apesar de terem sido conquistados avanços no controle do vetor, e na garantia da qualidade do sangue destinado à transfusão em muitos destes países, a doença continua relevante do ponto de vista epidemiológico na América Latina e os desafios ao controle são ainda maiores devido a falta de acesso ao diagnóstico e ao tratamento (DIAS et al. 2016).

Muitos indivíduos com a forma indeterminada da doença de Chagas não sabem que estão infectados, constituindo potenciais transmissores de *T. cruzi*, caso venham a realizar uma doação sanguínea, além de poderem vir a falecer devido a doença sem terem sido adequadamente diagnosticados (CAPUANI et al. 2017).

Além da forma clássica de transmissão do parasita por meio de vetores, outras formas como a ingestão de alimentos contaminados, a transfusão sanguínea, o transplante de órgãos, a transmissão congênita e os acidentes laboratoriais foram relatadas (ABRAS et al., 2016).

A transmissão de *T. cruzi* pela transfusão sanguínea é a segunda mais importante via de disseminação do parasita na América Latina e a mais importante em países não-endêmicos. *T. cruzi* consegue sobreviver em bolsas de sangue estocadas a temperaturas baixas (4°C a -80°C), podendo ser transmitido através de todos os hemocomponentes (sangue total, concentrado de hemácias, plasma fresco congelado, crioprecipitado e plaquetas) (SLAVOV et al. 2017).

Os fatores de risco de infecção transmitida por transfusão são a quantidade de sangue infundido, a cepa do parasita, a presença de parasitemia alta por parte do doador no momento da doação, estado imunológico do receptor e a sensibilidade dos testes diagnósticos para detectar a infecção antes da estocagem da bolsa de sangue. O maior índice de transmissão por transfusão foi observado em concentrados de plaquetas comparados ao plasma e sangue total, devido a maior carga parasitária nestes componentes (CANCINO-FAURE et al. 2015).

Os testes sorológicos de triagem para *T. cruzi* em sangue destinado à doação em países endêmicos reduziu drasticamente o risco de infecção transmitida por transfusão. No entanto, a sensibilidade destes ensaios é mais baixa em comparação com os testes de triagem para detecção de vírus, que chegam a 99%. Em países onde a rotina de triagem para a detecção de *T. cruzi* em bancos de sangue foi implementada, o risco residual de

infecção transmitida por transfusão foi estimado em 1 a cada 200.000 doações de sangue (ANGHEBEN et al. 2015). No Brasil, existem cerca de 55.000 doadores de sangue com resultados de testes sorológicos positivos para doença de Chagas e o risco de transmissão via sangue contaminado por transfusão é de 12% a 25% (MELO et al., 2015).

Como não existe vacina, as medidas de prevenção da doença de Chagas consistem basicamente no controle dos vetores e testes de triagem de doadores de sangue e de órgãos e testes em recém-nascidos de mães infectadas (GRANJON et al., 2016).

A maior dificuldade para realização do diagnóstico da doença de Chagas reside no fato de que a maioria dos pacientes não apresenta sintomas durante as fases aguda e crônica. Além disso, os testes diretos parasitológicos, como esfregaço sanguíneo, microhematócrito, hemoculturas e xenodiagnóstico, possuem sensibilidades muito baixas na fase crônica, variando de 50% a 70%, não sendo recomendados. Com isso, o diagnóstico é realizado quase exclusivamente por meio de técnicas sorológicas (ROCHA-GASO et al. 2017).

Diversos testes estão atualmente disponíveis, mas basicamente apenas três testes convencionais são largamente utilizados; hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e ELISA. Estes testes apresentam diversas limitações como reatividade cruzada com outros parasitas, como por exemplo *Leishmania*, baixa sensibilidade, necessidade de laboratórios dedicados para a condução dos testes e requerimento de longos tempos de análise, gerando resultados apenas qualitativos. Apesar disso, a Organização Mundial da Saúde recomenda a utilização de dois testes convencionais diferentes para o diagnóstico da infecção por *T. cruzi* (ROCHA-GASO et al. 2017).

Atualmente, uma pessoa é diagnosticada com infecção por *T. cruzi* na fase crônica da doença, quando os resultados de dois testes sorológicos diferentes resultam positivos. Se os resultados forem inconclusivos ou discordantes, uma terceira metodologia diagnóstica é utilizada ou novas amostras são requisitadas. Existem dois métodos de técnicas sorológicas para a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*: os testes convencionais utilizando o antígeno do parasita e os testes não convencionais baseados em antígenos recombinantes. Com relação aos testes convencionais, a reatividade cruzada é um problema em lugares onde a leishmaniose também ocorre. Apesar de estes ensaios estarem disponíveis para o diagnóstico da doença, nenhum deles é considerado padrão ouro (ABRAS et al., 2016). Além disso, o *T. cruzi* apresenta grande diversidade

genética e é dividido em seis genótipos conhecidos como *discrete typing units* (DTUs). Os resultados discordantes entre os diferentes ensaios sorológicos podem ser devidos às diferenças antigênicas entre as proteínas recombinantes ou as DTUs de *T. cruzi* (GUZMÁN-GÓMEZ et al., 2015; REIS-CUNHA et al., 2015; IZETA-ALBERDI et al., 2016).

Ferramentas diagnósticas sensíveis para a detecção da infecção por *T. cruzi* e marcadores de resposta parasitológica ao tratamento são prioridades na pesquisa da doença de Chagas. Para que isto seja possível, diversas dificuldades necessitam ser superadas, como o baixo ou intermitente número de parasitas circulantes durante a infecção e a diversidade genotípica do parasita. Os ensaios baseados em qPCR para detecção e quantificação do DNA de *T. cruzi* em pacientes com doença de Chagas tem sido utilizados, no entanto sua aplicação na prática requer estudos de validação analítica e clínica (RAMÍREZ et al. 2017).

O procedimento operacional padrão de qPCR mais largamente utilizado para a detecção do DNA do parasita, utiliza sondas *TaqMan* com alvo no DNA satélite de *T. cruzi*, e um controle interno de amplificação (RAMÍREZ et al. 2017). O alto número de cópias de sequências repetitivas contidas no DNA nuclear e na mitocôndria única que contém DNA chamada cinetoplasto (kDNA) de *T. cruzi* também permitiu a aplicação bem sucedida da PCR em tempo real para detectar o material genético do parasita em amostras clínicas (SAAVEDRA et al., 2016).

1.2 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença parasitária transmitida por vetores causada por protozoários parasitas obrigatórios do gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. O gênero *Leishmania* é subdividido em dois subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. A descrição inicial e a descoberta do agente causador da doença ocorreram entre 1898 e 1901 por P. Borovsky, W. B. Leishman e C. Donovan; e a primeira descrição oficial do gênero *Leishmania* foi feita por R. Ross em 1903 (WEYERS et al., 2016).

Aproximadamente 53 espécies de *Leishmania* foram descritas, destas, 31 são conhecidas como parasitas de mamíferos e 20 são patogênicas para os seres humanos (AKHOUND et al., 2016).

Os insetos vetores são membros da ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (AKHOUND et al., 2016). Estes vetores encontram-se em qualquer lugar do mundo onde as temperaturas do ambiente são maiores que 10°C, por isso estão distribuídos principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Assim como acontece em outras doenças endêmicas, o aumento da migração humana e animal contribui para a rápida disseminação do parasita através de indivíduos infectados e assintomáticos para novas regiões não endêmicas (AL-SALEM et al., 2016).

O ciclo de vida de *Leishmania sp.* também é heterógeno, envolvendo o hospedeiro vertebrado (mamífero) e o hospedeiro invertebrado (inseto flebotomíneo). No hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas metacíclicas infectantes são introduzidas através da picada do flebotomíneo fêmea. Dentro de alguns minutos, estas formas promastigotas flageladas são fagocitadas por células do sistema retículo-endotelial, onde se transformam em formas amastigotas intracelulares obrigatórias.

Os parasitas amastigotas são altamente especializados e perfeitamente adaptados para sobreviver dentro do fagolisossomo celular. Eles se multiplicam dentro dos fagócitos do hospedeiro (primariamente macrófagos e granulócitos neutrófilos), dos quais são liberados podendo assim infectar outras células. Após algumas semanas, o acúmulo de células inflamatórias (macrófagos, granulócitos neutrófilos, células dendríticas e linfócitos T), leva à formação de um granuloma característico. O ciclo de vida do patógeno se completa quando o inseto vetor ingere novamente as formas amastigotas de *Leishmania*, que se transformam em promastigotas no intestino do hospedeiro invertebrado (JARA et al., 2017) (Figura 2).

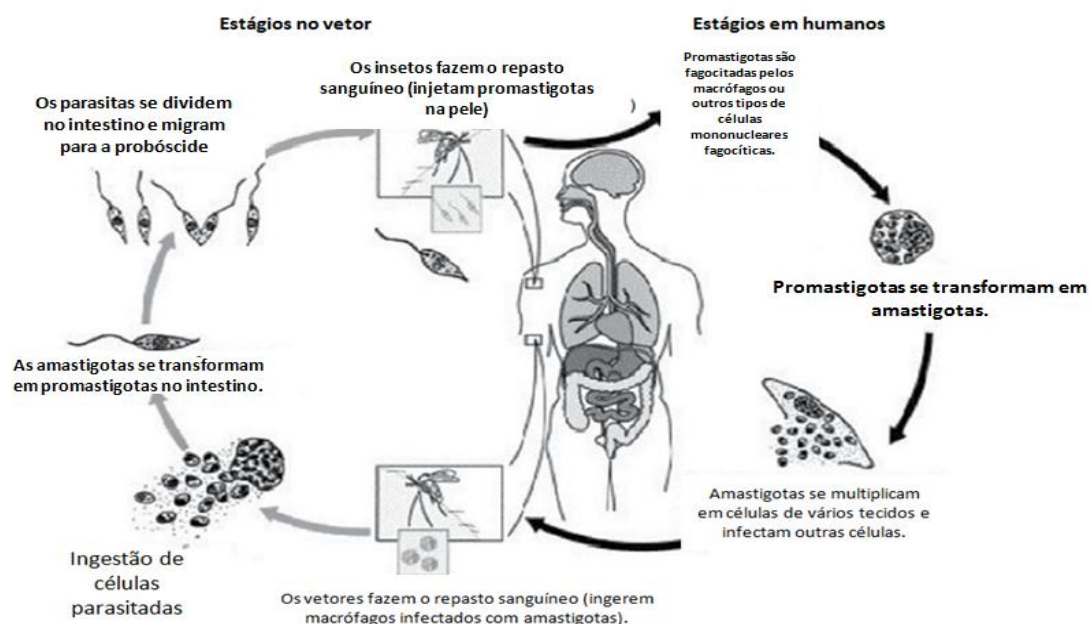


Figura 2: Ciclo de vida de *Leishmania sp.* em hospedeiros vertebrados e invertebrados. Imagem traduzida do Centro de Prevenção e Controle de Doenças disponível em <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

As formas clínicas da leishmaniose são classificadas de acordo com o acometimento dos tecidos no hospedeiro vertebrado. A leishmaniose visceral também chamada kalazar, acomete baço, fígado, órgãos linfáticos e medula óssea e é causada por *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum chagasi* (STAUCH et al., 2014). A leishmaniose dérmica pós-kalazar ocorre anos após a cura da leishmaniose visceral e é caracterizada por lesões hipopigmentadas na pele. A leishmaniose tegumentar é caracterizada por lesões papulares ou nódulos dérmicos e pode ser dividida em leishmaniose cutânea localizada, cujos agentes etiológicos são *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica*, *Leishmania tropica*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, e *Leishmania (Viannia) naiffi*; leishmaniose cutânea recidiva, causada por *Leishmania (Leishmania) aethiopica* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*; leishmaniose disseminada causada exclusivamente por *Leishmania (Viannia) braziliensis*; leishmaniose cutânea difusa que tem como agentes *L. (L.) mexicana* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* nas Américas e *Leishmania (Leishmania) aethiopica* no Oriente e leishmaniose mucosa e mucocutânea que envolve a destruição das cavidades oral-nasal e faríngea, provocada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (LINDOSO et al., 2016).

A leishmaniose também é classificada como doença tropical negligenciada, levando a óbito mais de 90% dos casos não tratados (WHO, 2017). Esta doença é endêmica em grandes áreas tropicais, subtropicais e da bacia mediterrânea, distribuindo-se em mais de 98 países. Nestas regiões há uma incidência estimada de 0,7 a 1,2 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 0,2 a 0,4 milhões de casos de leishmaniose visceral (AKHOUND et al., 2016). Existem cerca de 350 milhões de pessoas sob o risco de contrair a infecção e aproximadamente 12 milhões de casos confirmados da doença. A leishmaniose está entre a segunda e a quarta causa mais comum de morte e morbidade, respectivamente (AKHOUND et al., 2017).

A leishmaniose visceral está disseminada em cinco continentes e mais de 90% dos casos ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão, Brasil e Etiópia. No Brasil, a leishmaniose está se expandindo territorialmente, com casos autóctones em 25% dos municípios, em 21 dos 26 estados brasileiros. A doença é caracterizada por variações epidemiológicas, devido principalmente ao seu processo de urbanização, com casos humanos e caninos reportados em diferentes centros urbanos (REIS et al. 2017; CONTI et al. 2016). Recentemente, cerca de 300.000 novos casos da doença foram registrados, sendo que 20.000 a 50.000 mortes ocorrem anualmente no mundo (CONTI et al. 2016).

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), na América, foram reportados 51.098 casos de leishmaniose cutânea e mucosa, com uma taxa de incidência de 19,76 casos para cada 100.000 habitantes, sendo que no Brasil ocorreram 75% de todos os casos. Recentemente, apesar dos avanços alcançados por meio das estratégias de controle da doença, a sua incidência continua alta no Brasil (BRILHANTE et al. 2017).

A maioria dos indivíduos infectados por *Leishmania* não apresentam sintomatologia clássica, mostrando uma condição aparentemente saudável. Estes indivíduos assintomáticos, se vierem a se tornar doadores de sangue, poderão contribuir para a transmissão da doença através da transfusão. No nordeste do Brasil, a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* foi de 9% entre doadores de sangue, aumentando para 25% em regiões com foco de leishmaniose visceral, e foi maior (37%), em pacientes poli-transfundidos em hemodiálise. No centro-oeste brasileiro, a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* na população de doadores de sangue foi de 15,6%, indicando a presença de pessoas assintomáticas realizando doação de sangue em diferentes regiões do país (FUKUTANI et al. 2014).

Devido ao grande número de vetores envolvidos na transmissão da doença, métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos para a detecção do parasita são necessários para o controle da disseminação da leishmaniose (STAUCH et al., 2014).

O diagnóstico da leishmaniose é complexo devido à variedade de apresentações patológicas clínicas da doença. Além do mais, quadros clínicos semelhantes podem ser causados por diferentes espécies de *Leishmania*. Os sintomas geralmente são inespecíficos e podem ser confundidos com outras infecções que ocorrem em áreas endêmicas de leishmaniose (HORRILLO et al., 2015).

Algumas técnicas diagnósticas como o exame microscópico direto para detecção do parasita em esfregaços de biópsias, isolamento das formas promastigotas em culturas de tecidos e biópsias, isolamento dos parasitas em animais de laboratório, teste dérmico da leishmanina ou teste de Montenegro e o xenodiagnóstico, não discriminam entre as espécies de *Leishmania*, são laboriosas, não-quantitativas e pouco práticas. Os testes sorológicos não são aplicáveis à leishmaniose cutânea, pois a sensibilidade e especificidade podem variar e os níveis de anticorpos são muito baixos. A maioria dos testes sorológicos não consegue determinar se a infecção é crônica ou aguda (SAGI et al., 2017).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) proporciona alta sensibilidade e especificidade, e é considerado um método útil no diagnóstico de infecções por *Leishmania*, em espécimes clínicos. É a principal técnica molecular utilizada, apresentando vantagens como menor tempo de execução, sensibilidade, alta especificidade e diminuição do risco de contaminação do ambiente laboratorial, comparado às técnicas convencionais baseadas na pesquisa direta e culturas dos parasitas. O alvo mais comumente utilizado na PCR é o gene do kDNA, devido ao grande número de cópias do minicírculo em cada cinetoplasto, cerca de 10.000 por célula (BONI et al. 2016; ALMEIDA et al. 2017). A qPCR pode ser utilizada com sondas marcadas com diferentes fluoróforos num mesmo tubo de reação, possibilitando ensaios multiplex (SAGI et al. 2017).

Dentre os diferentes marcadores moleculares utilizados como alvos, destacam-se sequências conservadas de genes do RNA ribossomal (rRNA), da glicose-6-fosfato, do minióxon e da proteína de choque térmico 70 (HSP70) (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015; AKHOUND et al., 2017).

1.3 Malária

A malária é uma infecção parasitária de eritrócitos causada por protozoários do filo Apicomplexa e gênero *Plasmodium*. As espécies *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. knowlesi* e *P. ovale* estão entre os principais agentes causadores da doença em seres humanos. A transmissão aos seres humanos acontece através da picada de mosquitos do gênero *Anopheles* (reino Animalia, classe Insecta, filo Arthropoda) (MUKRY et al., 2016).

O parasita *Plasmodium* completa seu ciclo de vida em dois hospedeiros evolucionariamente distantes. O ciclo de vida sexuado é completado no inseto fêmea do gênero *Anopheles*, que é o hospedeiro primário definitivo, e o ciclo de vida assexuado predomina em humanos, que são os hospedeiros secundários. Ao realizar o repasto sanguíneo, o inseto ingere os parasitas no estágio de gametócitos que sofrem fertilização e formam o zigoto dentro do lúmen intestinal. Além do mais, no mesmo compartimento, a formação de oocinetos do zigoto se inicia cerca de 15 horas após a ingestão dos parasitas. Os oocinetos atravessam o epitélio do intestino médio aproximadamente 24 horas após a ingestão e se desenvolvem em oocistos no espaço entre o epitélio intestinal e a lâmina basal. Os oocistos sofrem maturação cerca de 10 dias depois e liberam milhares de esporozoítos no hemocélio do vetor. Os esporozoítos circulam através da hemolinfa e alguns deles chegam às glândulas salivares, onde são maturados e estão prontos para serem injetados em um novo hospedeiro humano durante o repasto sanguíneo (KAKANI et al., 2016).

O ciclo do parasita no hospedeiro humano se inicia com a entrada dos esporozoítos injetados pelo vetor na circulação sanguínea, que migram em direção ao fígado e iniciam o ciclo pré-eritrocítico em hepatócitos. Estas formas são chamadas hipnozoítos nas espécies *P. vivax* e *P. ovale* e possuem uma fase onde sua atividade metabólica é tão reduzida que não crescem e não se dividem (OLLIARO et al., 2016) e uma outra fase na qual o parasita sofre crescimento e divisão extensivos e no fim milhares de merozoítos são liberados no sangue. Os merozoítos invadem as hemácias e iniciam o ciclo eritrocítico. Este ciclo assexuado produz ainda mais merozoítos, os parasitas são então liberados das hemácias e imediatamente invadem novos eritrócitos. No ciclo eritrocítico alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos e após a ingestão por outro inseto, continuam o ciclo sexuado. Nos eritrócitos, o desenvolvimento dos parasitas é acompanhado de mudanças morfológicas como formas em anel, trofozoítos e

esquizontes (Figura 3). *Plasmodium falciparum* é responsável pela forma letal da malária humana. As formas maduras do parasita intra-eritrocitárias (trofozoítos e esquizontes) remodelam o citoesqueleto e a membrana plasmática para criar citoaderências bem como vias de penetração de nutrientes que alteram a estabilidade mecânica dos eritrócitos, causando a adesão destas células ao vaso sanguíneo. Isto leva ao bloqueio da microcirculação e resulta em disfunção de múltiplos órgãos, como o cérebro na malária cerebral, uma forma mais severa da infecção causada por *P. falciparum*, podendo levar a óbito, sendo que crianças são mais susceptíveis (OLORUNMOTENI et al., 2016; MUKRY et al., 2016).

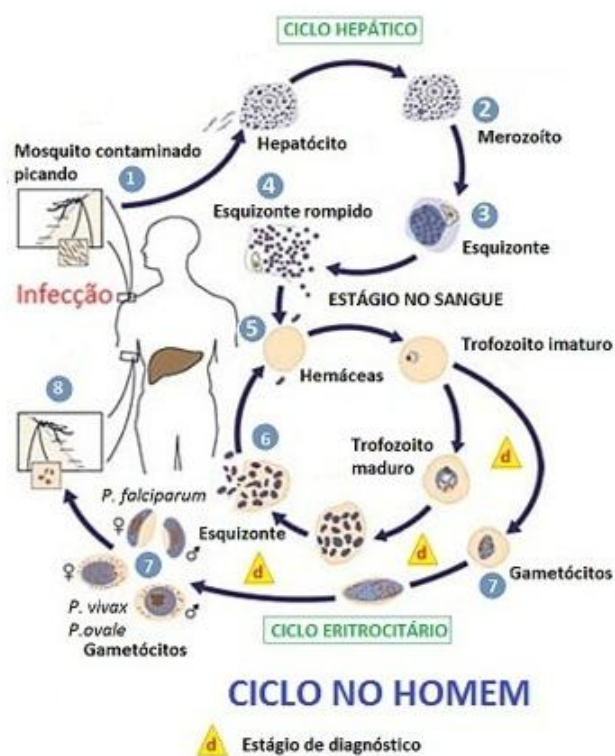


Figura 3: Ciclo de vida de *Plasmodium* sp. em hospedeiros primários e secundários. Imagem traduzida do Centro de Prevenção e Controle de Doenças disponível em <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

A malária é um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil com 145.000 casos reportados da doença em 2014 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Nas últimas quatro décadas, o Brasil compreendeu cerca de 30% dos casos de malária e em 2014 reportou 37% destes casos no continente americano.

A maioria dos casos ocorre na região amazônica que constitui área endêmica de malária. No entanto, migrações recentes de pessoas da região amazônica e/ou outros países para regiões não-endêmicas provocou surtos de casos secundários importados, introduzindo a doença nestas regiões (SIQUEIRA et al. 2016).

No Brasil, principalmente três espécies de *Plasmodium* estão relacionadas a infecção em humanos: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. A incidência relativa de malária por *P. vivax* e *P. falciparum* foi de 50% em 1988, mudando após 1990 quando 44,3% dos casos foram causados por *P. falciparum*. Em 2014 *P. vivax* se tornou a espécie predominante na região amazônica e apenas 16,18% dos casos foi provocado por *P. falciparum*. Apesar de *P. vivax* causar uma mortalidade mais baixa do que *P. falciparum*, a morbidade em regiões endêmicas é muito alta (LORENZ et al., 2015).

As espécies *P. vivax* e *P. falciparum* são responsáveis pela exposição de aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas ao risco de infecção no mundo (HOWES et al., 2016). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2014, a malária foi reportada em cerca de 90 países primariamente em regiões tropicais e subtropicais como a África subsaariana, América Central e do Sul, ilhas do Caribe e Espanhola, Oriente Médio, subcontinente indiano, sudeste asiático e Oceania. Existem em média mais de 198 milhões de pessoas infectadas e 584.000 pessoas morrem anualmente devido a doença (KAKANI et al., 2016).

A transmissão da malária no Brasil é fortemente afetada por questões sociodemográficas, políticas e ambientais da região amazônica. Apesar da incidência absoluta da malária ter reduzido no país apresentando um declínio de 80% nas taxas de mortalidade nos últimos 15 anos, houve um incremento na proporção de casos causados por *P. vivax*, que se tornou a espécie predominante (SIQUEIRA et al, 2016).

Apenas 19% de todos os casos de malária em regiões não-endêmicas são diagnosticados e tratados em até 48 horas após o aparecimento dos sintomas, o que explica o aumento da proporção de casos de malária severa e a alta taxa de mortalidade nestas regiões. Além do mais, a falta de experiência dos profissionais de saúde em diagnosticar e tratar a doença é um fator agravante frente as estratégias de controle (LORENZ et al. 2015). A malária também pode se apresentar sob forma de infecção assintomática, onde a parasitemia baixa em possíveis candidatos à doação de sangue possibilita a transmissão da infecção por transfusão e o diagnóstico nesta condição depende de testes altamente sensíveis (ALHO et al. 2017).

A malária assintomática ou subclínica se refere à presença dos parasitas no sangue com ausência total de sintomas, propiciando reservatórios para a transmissão. Estudos mais recentes têm observado que comunidades que vivem em áreas de baixa transmissibilidade estão também sob o risco de parasitemia assintomática (BOUSEMA et al., 2014). A presença de um grande número de portadores assintomáticos na

população constitui um obstáculo adicional aos programas de controle da malária (LINDBLADE et al., 2013; OLLIARO et al., 2016).

Os bancos de sangue realizam uma triagem do estado de saúde de candidatos à doação, incluindo uma história detalhada de doenças prévias e viagens a áreas endêmicas. Os critérios da hemovigilância são definidos em cada país, através de suas agências nacionais de regulação. No Brasil, as políticas para doação de sangue diferem entre regiões endêmicas e não-endêmicas de malária (ALHO et al. 2017).

Os guias brasileiros de hemoterapia recomendam testes para detecção do parasita em áreas endêmicas e exclusão de doadores com histórico de infecção nos 12 meses que precedem a doação ou que apresentarem sintomas 30 dias antes da doação. Em áreas não-endêmicas, ocorre a exclusão de candidatos que estiveram em áreas endêmicas 30 dias antes da doação. Em áreas endêmicas e não endêmicas, doadores que tiveram infecção por *P. malariae* ficam permanentemente inaptos para realizar a doação de sangue (LIMA et al., 2016).

A detecção microscópica de *Plasmodium sp.* tem baixo custo, é sensível e específica, no entanto, requer experiência e pode ser muito laboriosa quando a densidade parasitária for muito baixa. Para detectar baixos níveis de parasitemia e co-infecções, foram desenvolvidos testes rápidos imunocromatográficos, utilizando antígenos do parasita ou aldolases pan-específicas e testes baseados no princípio do ELISA sanduíche. Estes testes são mais baratos, sensíveis e específicos, embora possuam baixa especificidade para algumas espécies, como *P. ovale*. Detecção automatizada por analisadores hematológicos é outra opção em casos de suspeita clínica, onde resultados anormais confirmados pela microscopia podem sugerir uma infecção (MUKRY et al., 2016; BRITTON et al., 2016).

O diagnóstico sorológico também pode ser aplicado utilizando antígenos derivados de peptídeos sintéticos, no entanto possui baixa especificidade para a detecção de infecções agudas. Técnicas moleculares como a PCR são mais confiáveis e podem ser utilizadas para o diagnóstico da malária, sendo altamente sensíveis para detectar níveis muito baixos de parasitemia (1 a 0,02 parasitas/ μ L) (BAIRD et al., 2016). Estas técnicas requerem um tempo de preparação e análise relativamente curtos, e possuem um custo menor, devido ao uso de pequenos volumes e primers e sondas de baixo custo, em comparação com outras técnicas moleculares (KRAMPA et al. 2017).

A amplificação da subunidade menor do rRNA 18S foi primeiramente realizada por Snounou (1996) utilizando a técnica de *nested* PCR, a mais amplamente utilizada para o diagnóstico molecular da malária.

As técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NATs) utilizando a PCR em tempo real, por serem capazes de detectar infecções assintomáticas e submicroscópicas, podem ser aplicadas à triagem de candidatos à doação de sangue. A sensibilidade do teste para identificar baixos níveis de parasitemia tem sido aumentada realizando a qPCR com DNA de amostras de sangue com volumes superiores a 1mL, apresentando um limite de detecção de até 0,022 parasitas/ μ L (BRITTON et al., 2016).

1.4 Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma doença parasitária causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* pertencente ao filo Apicomplexa. Este parasita é capaz de infectar uma ampla variedade de vertebrados de sangue quente e foi considerado um dos patógenos eucarióticos mais bem sucedidos em relação ao número de espécies hospedeiras e percentual de animais infectados globalmente (LIU et al., 2015; XIAO et al., 2016). *T. gondii* é considerado uma espécie única dentro do gênero *Toxoplasma*, possuindo uma diversidade genética limitada (LIU et al., 2015).

O ciclo de vida de *T. gondii* é complexo envolvendo replicação sexuada em membros da família Felidae como hospedeiros definitivos e propagação assexuada em outros vertebrados de sangue quente que são os hospedeiros intermediários. Existem diferentes formas infectantes deste parasita, os taquizoítos que facilitam a expansão durante a fase aguda, os bradizoítos que mantêm a infecção crônica e os esporozoítos que são eliminados no ambiente junto com os oocistos (XIAO et al., 2016; LÜDER et al., 2017).

Os taquizoítos se desenvolvem no epitélio intestinal dos hospedeiros intermediários após a transmissão oral de formas infectantes de esporozoítos ou bradizoítos. Logo depois se dividem rapidamente dentro do vacúolo parasitóforo por um processo chamado endodigenia. Os taquizoítos são metabolicamente bastante ativos e após 5 a 6 divisões celulares saem da célula hospedeira podendo infectar novas células. A infecção ativa da célula hospedeira permite ao parasita a invasão de qualquer célula nucleada. A replicação do parasita com dano tecidual devido à lise celular corresponde à

fase aguda da doença, na qual a resposta imune mediada por células do hospedeiro pode inibir a replicação dos taquizoítos ou até mesmo matá-los (LÜDER et al., 2017).

Os bradizoítos localizados dentro do vacúolo parasitóforo sofrem maturação e se diferenciam em cistos teciduais intracelulares, que podem conter centenas de bradizoítos, que se replicam lentamente e são metabolicamente inativos. Estas estruturas localizam-se sobretudo no cérebro e tecido muscular, mas podem ser encontradas em outros órgãos como fígado e rins. Estes cistos teciduais persistem por longos períodos e possibilitam a transmissão do parasita a outros hospedeiros (Figura 4). Em pacientes imunocomprometidos, ocorre rediferenciação de bradizoítos e replicação rápida de taquizoítos, levando a reativação da doença sob a forma de encefalite toxoplasmática (LIU et al., 2015; LÜDER et al., 2017).

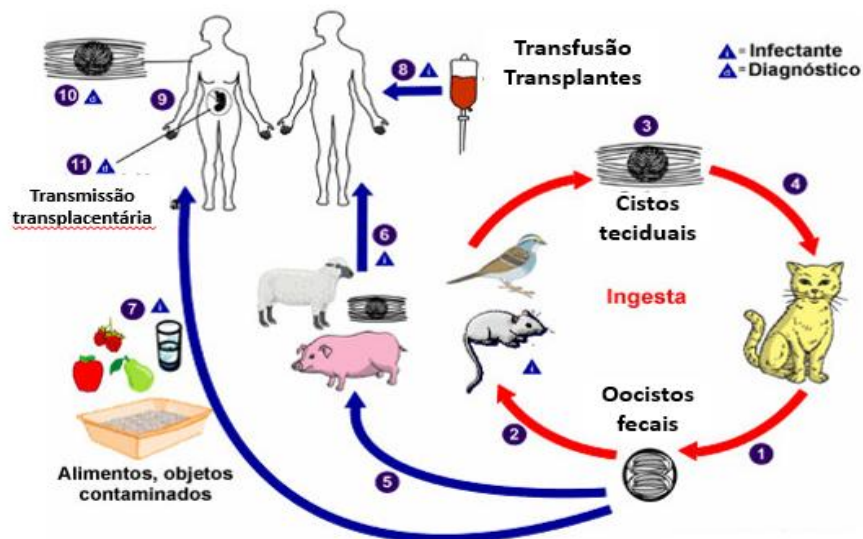


Figura 4: Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* em hospedeiros definitivos e intermediários. Imagem traduzida do Centro de Prevenção e Controle de Doenças disponível em <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

A infecção em seres humanos acontece tipicamente através da ingestão de carne crua mal cozida contaminada com cistos teciduais viáveis ou por meio da ingestão de alimentos ou água contaminados por oocistos de *T. gondii* liberados no ambiente através das fezes dos hospedeiros definitivos. Outras formas possíveis de disseminação de *T. gondii* são a transmissão congênita de mães infectadas para o feto, contaminação através de esperma e de leite não pasteurizado contendo taquizoítos e transfusão sanguínea e transplante de órgãos de doadores infectados (VANWORMER et al., 2013; ZAINODINI et al., 2014).

Os sintomas clínicos da infecção por *T. gondii* são geralmente inespecíficos e se caracterizam por febre, mal-estar e linfadenopatia, sendo que a maior parte das infecções é assintomática. Em casos de imunodeficiência, o parasita pode causar encefalite, miocardite e pneumonia e na transmissão congênita, retardo mental, complicações oculares e neurológicas no feto, podendo levar a óbito (LIU et al., 2015; XIAO et al., 2016).

Toxoplasma gondii infecta aproximadamente um terço da população humana mundial. A toxoplasmose é tipicamente assintomática, mas a doença clássica pode se desenvolver em pacientes imunocomprometidos e por transmissão congênita, provocando alterações oculares e neurológicas graves. (COMMODARO et al. 2015). A prevalência da toxoplasmose é extremamente variável entre os países e dentro de diferentes regiões no mesmo país, devido à distribuição global das fontes de infecção e à exposição diferencial dos indivíduos a elas, além dos hábitos culturais e de higiene variados (SILVA et al. 2015). Por isso, *T. gondii* tem alto risco potencial de transmissão por transfusão de hemocomponentes. De acordo com Karimi et al. (2016), *T. gondii* é capaz de sobreviver no sangue e seus componentes estocados a 4°C por cerca de 50 dias. Neste trabalho, a taxa de sororeatividade para toxoplasmose em doadores de sangue variou de 18,3% a 56,4%. Além disso, existem relatos da presença de anticorpos IgM anti-*T. gondii* em doadores de sangue no mundo (ZAINODINI et al., 2014).

Embora métodos diagnósticos de detecção do parasita por microscopia ou bioensaios sejam considerados padrão ouro, o diagnóstico clínico da infecção é feito geralmente por métodos sorológicos. Vários testes foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos específicos ou antígenos circulantes. Os métodos moleculares são utilizados em conjunto com as técnicas sorológicas convencionais, que apesar de confiáveis, são limitadas para o diagnóstico pré-natal, de pacientes imunocomprometidos e para a triagem de doadores de sangue, pois em alguns indivíduos infectados, os anticorpos IgM persistem após a fase aguda, e também alguns pacientes na fase aguda não produzem anticorpos IgM contra o parasita de forma imediata (ZAINODINI et al., 2014; MANSOURI et al., 2017).

A PCR em tempo real pode detectar concentrações extremamente baixas do DNA alvo de *T. gondii*, em espécimes como sangue, fluido cefalorraquidiano, humor aquoso e líquido amniótico. Além disso, a PCR é também utilizada para avaliar a progressão da doença e a eficácia do tratamento, por estimativa da intensidade da infecção (LIU et al., 2015).

Para o diagnóstico molecular da toxoplasmose, existem dois tipos de métodos moleculares: a identificação do DNA em fluidos biológicos por PCR, *nested*-PCR e PCR em tempo real; e a análise do microssatélite para identificação das cepas dos parasitas (MOUSAVI et al., 2016)

Encontrar as sequências alvo adequadas do gene e o desenho correto dos primers para a implementação da PCR é altamente importante. Métodos moleculares utilizados em diversos laboratórios no mundo para identificar as formas de *T. gondii* utilizam como alvos de amplificação o gene do elemento repetitivo de 529 pb, com 200 a 300 cópias e o gene B1 com 35 cópias no genoma. A precisão e sensibilidade destes dois alvos foram comparadas e a positividade na PCR foi encontrada em amostra de pacientes com resultados sorológicos negativos, comprovando que a PCR diminui a janela imunológica para detecção de *T. gondii* (MOUSAVI et al. 2016).

1.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica molecular que foi desenvolvida por Kary Mullis em 1983, caracterizada por promover a multiplicação de cópias de sequências alvo do DNA chamadas amplicons. Nesta reação, tanto o DNA como o DNA complementar (cDNA) obtido por transcrição reversa do RNA podem ser utilizados. A mistura química da PCR conhecida como master mix contém nucleotídeos, conjuntos de primers, uma enzima DNA polimerase termoresistente (Taq DNA polimerase) e outros componentes como magnésio. Os primers são sequências curtas de DNA de fita simples; sendo um dos primers é complementar à sequência alvo no sentido 3'-5' e o outro primer é complementar no sentido 5'-3'. O método da PCR convencional requer a execução de eletroforese ou hibridização para detectar a presença e pureza do amplicon (AHRBERG,NEUZIL, 2015).

Higuchi et al. (1992) introduziram um marcador fluorescente (fluoróforo) ao mix para monitorar a reação, surgindo assim a PCR em tempo real, permitindo a determinação de uma concentração inicial de DNA e a mensuração da expressão gênica e das cópias do DNA alvo, por isso este método é comumente chamado de PCR quantitativa (qPCR) (ZHANG et al. 2015). A PCR em tempo real permite a obtenção de dados quantitativos à medida em que a amplificação ocorre. Esta reação é caracterizada pelo número de ciclos onde a amplificação pode ser detectada porque a intensidade de fluorescência é maior que o ruído de fundo (*background*) gerado pelos próprios

reagentes do mix, este fenômeno é referido como ciclo limiar ou de *threshold* (C_T). Com base nisso, quanto maior a quantidade inicial do DNA alvo, mais precocemente aparecerá um aumento na intensidade de fluorescência, resultando num valor de C_T mais baixo (ZHANG et al., 2015).

Os métodos mais usados para a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) possuem em sua composição corantes cianina fluorescentes intercalantes como o *Sybr Green*, que realiza ligações não-específicas a qualquer DNA de fita dupla. Quando estas ligações acontecem, o sinal de fluorescência é amplificado em mais de 1.000 vezes. A intensidade total de fluorescência é proporcional ao número de amplicons e aumenta quando o gene alvo é amplificado (YANG et al., 2016).

Uma peculiaridade da PCR em tempo real é a curva de dissociação ou *melting*, que pode ser analisada após o término da reação. Durante a PCR, a amostra é aquecida lentamente enquanto a intensidade de fluorescência é monitorada, em temperaturas mais elevadas, as duplas fitas dos amplicons se tornam fitas simples, em consequência disso a amplitude de fluorescência diminui. Quando a metade do material genético (DNA) fita dupla se torna fita simples, a temperatura é chamada temperatura de *melting* (T_M), a qual caracteriza o comprimento e sequência do amplicon (AHRBERG;NEUZIL, 2015).

Outro método de PCR em tempo real conhecido como *TaqMan* é baseado em sondas fluorogênicas como a 6-carboxifluoresceína (FAM), tetraclorofluoresceína (TET), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), disulfo-Cy5 ácido carboxílico, fosforamidita (HEX) e cloreto ácido de sulforodamina (Texas Red). Estas sondas são quimicamente acopladas à extremidade 5' dos oligonucleotídeos e a um corante silenciador como a tetrametilrodamina (TAMRA) na extremidade 3', esta proximidade permite que o silenciador quando excitado, por exemplo, por transferência energética ressonante fluorescente (FRET), iniba o sinal de fluorescência do fluoróforo. Quando os primers se anelam ao DNA, a atividade exonuclease da Taq DNA polimerase degrada a sonda, com isso, o fluoróforo acoplado à sonda é liberado, diminuindo a proximidade e o efeito do silenciador e permitindo o aumento da amplitude de fluorescência. Esta metodologia é gene-específica e requer que os oligonucleotídeos sejam sintetizados acoplados às sondas com o fluoróforo e o silenciador (NAVARRO et al. 2015) (FIGURA 5).

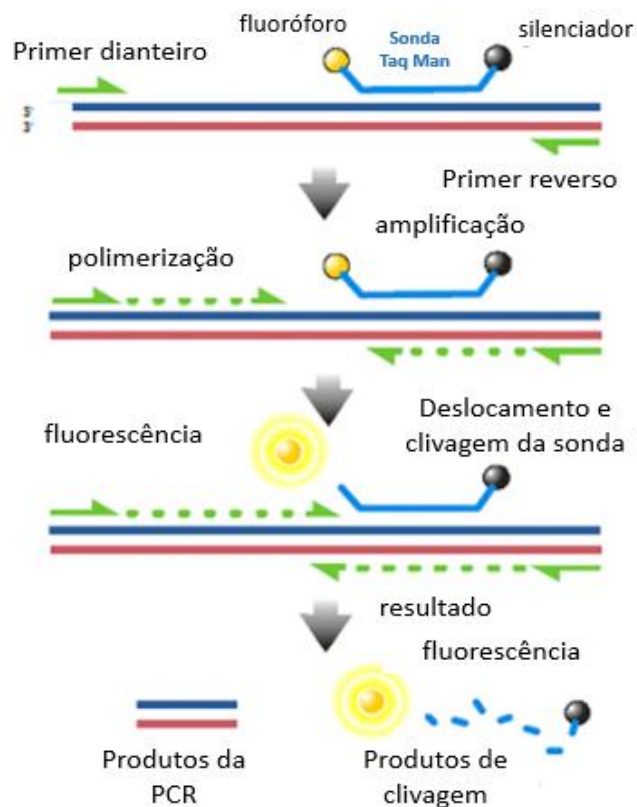


Figura 5: Etapas da qPCR em tempo real TaqMan. Imagem traduzida de Wikimedia Commons disponível em <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Taqman.png>.

1.6 Justificativa

A realização do teste NAT utilizando a PCR em tempo real é de particular interesse como aplicação na triagem de sangue de candidatos à doação, sobretudo para a detecção e quantificação do DNA de protozoários parasitas de alta relevância clínica e epidemiológica como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp.*, *Plasmodium spp.* e *Toxoplasma gondii*. A implementação desta ferramenta molecular nos bancos de sangue brasileiros tem o propósito de aumentar significativamente a segurança transfusional.

Atualmente, no Brasil, protozoários parasitas não são detectados em testes de triagem para doação de sangue. Estes parasitas podem ser transmitidos através da transfusão sanguínea e a consequência para os pacientes receptores, especialmente os imunocomprometidos, pode ser fatal. Daí a importância da implementação de um teste baseado em técnicas moleculares como o NAT para a detecção e a quantificação altamente sensível do DNA destes parasitas em bolsas de sangue destinadas à transfusão.

O teste NAT desenvolvido neste trabalho tem o intuito de reduzir significativamente as janelas imunológicas de detecção das infecções por *T.cruzi*,

Leishmania sp, *Plasmodium sp* e *T. gondii*, sugerindo a sua implementação em rotina aplicável a bancos de sangue para exames de triagem utilizando a qPCR *Sybr Green* e exames confirmatórios utilizando a qPCR *TaqMan*, ambos altamente sensíveis e específicos, para detectar parasitemias baixas em doadores assintomáticos com resultados sorológicos negativos.

2 OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo do trabalho é desenvolver um kit diagnóstico NAT (*nucleic acid amplification test*) por PCR em tempo real para a detecção de DNA de protozoários patógenos em bolsas de sangue destinadas à transfusão sanguínea no Distrito Federal.

2.2 Específicos

- Desenvolver e testar os protocolos para a PCR em tempo real *Sybr Green* e a PCR em tempo real *TaqMan*.
- Testar a especificidade e sensibilidade dos primers, eficiência da técnica e o limite de detecção utilizando DNA das culturas celulares de parasitas.
- Otimizar a metodologia do sistema NAT com PCR em tempo real para a detecção de todos parasitas propostos nesse projeto: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania sp.*, *Plasmodium sp.* e *Toxoplasma gondii*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estratégia experimental

A estratégia experimental consistiu no desenvolvimento do kit diagnóstico NAT em uma primeira etapa, na qual as cepas de *T. cruzi* foram cultivadas e o DNA extraído para realização dos testes. O DNA das cepas de *Leishmania spp.*, *P. falciparum* e *T. gondii* foram obtidos já extraídos e purificados. Posteriormente foram selecionados e desenhados os oligonucleotídeos para utilização na PCR convencional, para confirmação das linhagens filogenéticas de *T. cruzi*.

Na segunda etapa, foram selecionados, desenhados e enviados para síntese os primers para a realização dos testes de eficiência, sensibilidade e especificidade por qPCR *Sybr Green* e por qPCR *TaqMan*, esta última após a seleção, desenho e síntese das sondas fluorogênicas específicas (Figura 6).

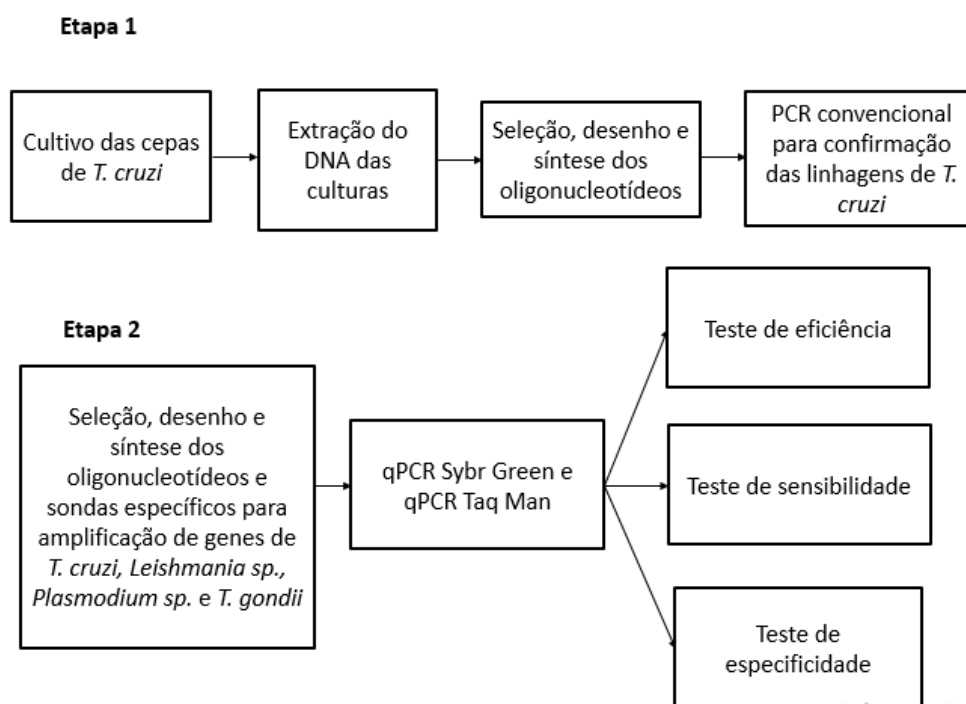


Figura 6: Estratégia experimental do teste NAT para detecção de parasitas protozoários. Esquema representativo da estratégia experimental utilizada na validação do kit diagnóstico NAT para detecção de parasitas protozoários em amostras destinadas à doação de sangue.

3.2 Oligonucleotídeos para a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional

Para determinar as linhagens filogenéticas com relação aos genes do miniéxon de *Trypanosoma cruzi*, os três oligonucleotídeos descritos na Tabela 1 foram sintetizados e testados com DNA das cepas CL Brener, G e Y.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na PCR convencional para amplificação de uma porção específica do gene do miniéxon de *T. cruzi*.

Nome	Alvo	Sequência 5' 3'	TM
PR440	Espaçador intergênico não transcrito do miniéxon de <i>Trypanosoma cruzi</i> .(TC1)	CCCCCCTCCCAGGCCACACTG	69
PR441	Região intergênica spliced leader do miniéxon de <i>T. cruzi</i> (TC2)	GTGTCCGCCACCTCCTTCGGG CC	71
PR442	Região repetitiva spliced leader do miniéxon de <i>T. cruzi</i> (TC)	CCTGCAGGCACACGTGTGTGT G	67

3.3 Oligonucleotídeos para a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real *Sybr Green* e *TaqMan*

Para avaliação da eficiência, sensibilidade e especificidade dos primers e sondas por PCR em tempo real *Sybr Green* e *TaqMan*, a sequência dos oligonucleotídeos utilizados foi desenhada e determinadas características como tamanho do fragmento amplificado gerado (50 a 150 pb), especificidade de amplificação contra o organismo alvo (100% de homologia com o gene alvo) e temperatura de dissociação (*melting*), foram confirmadas com o auxílio da ferramenta Nucleotide Blast do National Centre for Biotechnology Information (NCBI) disponível on-line no endereço eletrônico <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Foi analisada também a possibilidade de formação de estruturas secundárias como dímeros, *hairpins* e *internal loops*, intra e intermoleculares entre as cadeias de primers.

Os oligonucleotídeos com sequências específicas para a amplificação dos genes de *T. cruzi*, *Leishmania spp.*, *Plasmodium sp.* e *Toxoplasma gondii* estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na PCR em tempo real para amplificação dos genes de *T. cruzi*, *Leishmania sp.*, *Plasmodium sp.* e *Toxoplasma gondii*.

NOME	Alvo	SEQUENCIA 5' 3'	TM
PR436	Gene do RNA ribossomal 28S de <i>Trypanosomatidae sp.</i>	TAGCCCTTCCGATGTAGATG	57
PR437	Gene do RNA ribossomal 28S de <i>Trypanosomatidae sp.</i>	TTGCTACGCCAACCAAGATC	57
PR612	Sequência satélite do DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	ATCGGCTGATCGTTTTTCGA	58
PR613	Sequência satélite do DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	58
PR615	Gene da aminoácido permease 3 (AAP3) de <i>Leishmania sp.</i>	GGCGGCGGTATTATCTCGAT	60
PR616	Gene da aminoácido permease 3 (AAP3) de <i>Leishmania sp.</i>	ACCACGAGGTAGATGACAGACA	60
PR640	Gene do RNA ribossomal 18S de <i>Plasmodium sp.</i>	GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAG A	60
PR641	Gene do RNA ribossomal 18S de <i>Plasmodium sp.</i>	AACCCAAAGACTTTGATTTCTCAT AA	60
PR618	Gene B1 de <i>Toxoplasma gondii</i>	TCCCCTCTGCTGGCGAAAAGT	64
PR619	Gene B1 de <i>Toxoplasma gondii</i>	AGCGTTCGTGGTCAACTATCGATT G	64

Foram sintetizadas sondas fluorogênicas específicas, para serem utilizadas em conjunto com os primers descritos acima na PCR em tempo real *TaqMan*, a fim de promover a amplificação específica de genes do DNA de todos os protozoários parasitas utilizados nos experimentos (Tabela 3).

Tabela 3. Sondas utilizadas na PCR em tempo real *TaqMan* para amplificação específica dos genes de *T. cruzi*, *Leishmania sp.*, *Plasmodium sp.* e *Toxoplasma gondii*.

NOME	Alvo	SEQUENCIA 5' 3'
PR614	Sequência satélite do DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5'-56-FAM-AGA GGC ACT-ZEN-CTC TTT CAC TAT C- 3IABkFQ-3'
PR617	Gene da aminoácido permease 3 (AAP3) de <i>Leishmania sp.</i>	5'-5 HEX-CTT CGC CAT- ZEN-GTC GGG CAT C- 3IABkFQ-3'
PR642	Gene do RNA ribossomal 18S de <i>Plasmodium sp.</i>	5'-5HEX-ACC GTC GTA-ZEN- ATC TTA ACC ATA AAC TAT GCC GAC TAG 3IABkFQ-3'
PR620	Gene B1 de <i>Toxoplasma gondii</i>	5'-56-FAM-TAT TCG CAG-ZEN-ATT GGT CGC C-3IABkFQ-3'

3.4 Cultivo celular das cepas de *T. cruzi*

Para alcançar os objetivos propostos neste trabalho, foram primeiramente cultivadas as formas epimastigotas das cepas G, CL Brener e Y de *T. cruzi* em meio líquido LIT (*liver infusion tryptose*); o DNA das cepas *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* de *Leishmania sp.*, *P. falciparum* e *T. gondii* utilizado nos experimentos já se encontrava extraído, purificado e armazenado a 4°C.

Foi realizado o escalonamento das linhagens de *T. cruzi* em meio líquido LIT, composto por 0,5 % de extrato de fígado, 2% de triptose, 2% de glicose, 4% de NaCl, 0,4% de KCl, 8% de Na₂HPO₄ e suplementado com 10% de soro fetal bovino e adicionado de mistura de antibióticos (estreptomicina+penicilina) e hemina (1mL/L). Foi mantida uma taxa de crescimento constante das cepas, mediante aumento do volume de meio e conseqüentemente da quantidade de células dos parasitas.

O escalonamento das culturas foi realizado para cada uma das cepas de *T. cruzi* na proporção de uma parte da cultura para quatro partes do meio, até que a contagem realizada em câmara de Neubauer resultasse em uma quantidade de 2x10⁷ células/mL.

A manipulação das culturas para o escalonamento foi realizada na sala de cultura do Laboratório da Biologia do Gene, em câmara de fluxo laminar classe II Bio Seg 12 Revco, levando em conta as boas práticas laboratoriais, com materiais esterilizados e livres de DNases e RNases, bem como reagentes dedicados. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer e a incubação das culturas foi feita em estufa Retilinea Fanem a 28°C.

As cepas foram posteriormente congeladas em meio de congelamento com 20% de soro fetal bovino, 10% de DMSO e 70% do meio LIT. As células que não foram congeladas desta maneira foram preparadas para extração, onde o volume total da cultura foi centrifugado a 1.370 g por 10 min na centrífuga Eppendorf 5804R. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento de células foi ressuspensão em solução PBS 1X autoclavada (NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 7 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM) e utilizado para a extração do DNA.

3.5 Extração do DNA

O processo de extração do DNA total das células obtidas das culturas das três cepas de *T. cruzi*, foi realizado com o kit PureLink^M Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

A quantificação do material genético foi realizada no espectrofotômetro Nano Drop Lite (Thermo Scientific) e resultou em uma média de 90 ng/μL de DNA para cada uma das três cepas de *T. cruzi* e *Leishmania sp*, e das cepas de *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii*.

3.6 PCR convencional

Para a realização da PCR convencional utilizando os primers cujo alvo é a região intergênica do mini-éxon de *T. cruzi* (Tabela 1), cada uma das amostras de DNA foi diluída em água Milli-Q até uma concentração final de 10ng/μL.

Os sistemas de PCR foram feitos para o volume final de 30 μL constituído de Tampão 1X, 1X de BSA; 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 1,5 unidades de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen/Life Technologies), 1 μL de cada um dos primers e 2 μL do DNA, o volume foi completado com água Milli-Q até uma quantidade suficiente para 30 μL por reação. O controle negativo foi realizado utilizando água Milli-Q ao invés do DNA do parasita.

As amostras foram amplificadas no equipamento iCycler BioRad e os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose na concentração de 2,5%, marcado com brometo de etídeo solução estoque 10 mg/mL. Os produtos de amplificação no gel foram revelados no transiluminador UV BioRad.

Foram aplicados no primeiro poço do gel de agarose 5 µL do marcador de massa molecular *100 bp ladder* (Invitrogen) e nos demais poços 10 µL dos produtos de amplificação do controle negativo e das amostras.

3.7 Estudo da eficiência da técnica de PCR em tempo real

O estudo da eficiência foi realizado para determinar a manutenção da linearidade do teste frente a diferentes concentrações do DNA dos parasitas. Os testes foram executados por qPCR *Sybr Green* e posterior aplicação de uma regressão linear em relação às variáveis $y(Ct)$ versus $x(\text{Log das concentrações de DNA em ng})$.

O cálculo da eficiência da PCR foi efetuado automaticamente através do StepOne software versão 2.3, utilizando o declive da reta obtida na regressão linear.

Na realização dos testes de eficiência da técnica, foram utilizados os pares de primers cujo alvo é o gene da sequência satélite do DNA de *T. cruzi* para a cepa CL Brener de *T. cruzi*. Para testar o DNA da cepa *L. infantum* de *Leishmania sp.*, foram utilizados os pares de primers que possuem como alvo o gene da AAP3 de *Leishmania sp.* No teste com o DNA de *P. falciparum*, foram utilizados os primers com alvo no RNA ribossomal 18S e no teste com DNA de *T. gondii*, foi utilizado o par de primers com alvo no gene B1 de *T. gondii*. O DNA obtido de todas as cepas foi diluído em água Milli-Q até uma concentração final de 1.000 pg utilizando pipetas DNase free e microtubos esterilizados. Com o DNA das cepas nesta concentração inicial de 1.000 pg, foram realizadas 5 diluições seriadas na proporção de 1/10 com água Milli-Q utilizando 90 µL de água e 10 µL do DNA de cada uma das cepas.

Dentro do sistema, foram pipetados em cada poço de reação da microplaca MicroAmp® Fast Optical com 96 poços:

5 µL do MIX *Sybr Green* (Life Technologies)

0,2 µL de cada primer na concentração estoque de 10 µM.

3,6 µL de água MilliQ

1 µL de DNA do parasita

O volume final da reação foi de 10µL.

O teste foi realizado em triplicata para cada uma das diluições do DNA da cepa CL Brener de *T. cruzi*, *L. infantum* de *Leishmania sp.*, e de *P. falciparum* e *T. gondii*.

Em cada sessão de PCR *Sybr Green* foi efetuado um controle negativo testado em triplicata para cada par de primers. O controle negativo foi executado com água Milli-Q ao invés de DNA dos parasitas.

3.8 Avaliação da sensibilidade dos primers e sondas

O teste de sensibilidade dos primers foi realizado para determinar a menor concentração detectável após diluições seriadas do DNA extraído das culturas celulares dos parasitas. No teste por qPCR *Sybr Green*, foram realizadas 5 diluições seriadas na proporção 1/10 dos DNAs de todas as cepas de *T. cruzi* e de *Leishmania spp.* e das cepas de *P. falciparum* e *T. gondii*. Na PCR em tempo real *TaqMan* foram utilizadas 7 diluições seriadas na proporção de 1/10, testando o DNA da cepa CL Brener de *T. cruzi*, *L. infantum* de *Leishmania sp.* e das cepas de *P. falciparum* e *T. gondii*.

Para determinação da reprodutibilidade intra-ensaio, cada uma das diluições de DNA das cepas dos parasitas, utilizando os primers descritos na Tabela 2 e as sondas na Tabela 3, foi testada em triplicata na qPCR *Sybr Green* e em duplicata na qPCR *TaqMan*.

Para a execução dos testes de sensibilidade por qPCR *Sybr Green*, o DNA das três cepas de *T. cruzi* e de *Leishmania sp.* foi testado com os primers com alvo no rRNA 28S de *Trypanosomatidae*. Os primers com alvo na sequência satélite do DNA de *T. cruzi* foram testados com DNA das três cepas de *T. cruzi*, o DNA das três cepas de *Leishmania sp.* foi testado com os primers com alvo no gene da AAP3 de *Leishmania sp.*, o DNA de *P. falciparum* foi testado com os primers com alvo no gene do rRNA 18S e o DNA de *T. gondii* foi testado com os primers com alvo no gene B1. Nestes experimentos, para que fossem simuladas as condições reais do teste, foi extraído o DNA de amostras de sangue periférico de 10 indivíduos saudáveis e foi realizada uma mistura (*pool*) destas amostras de DNA humano. O DNA do *pool* de amostras humanas foi diluído em água Milli-Q até uma concentração final de 1.000 pg. Com o DNA obtido das cepas G, Y e CL Brener de *T. cruzi*, das cepas *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. brasiliensis* de *Leishmania spp.*, de *P. falciparum* e de *T. gondii*, na concentração inicial de 1.000 pg foram realizadas 5 diluições seriadas na proporção de 1/10, utilizando 90 µL de água Milli-Q e 10 µL do DNA de cada uma das cepas, utilizando pipetas DNase free e microtubos esterilizados.

Dentro do sistema, foram pipetados em cada poço de reação da microplaca MicroAmp® Fast Optical com 96 poços:

5 µL do MIX *Sybr Green* (Life Technologies)
0,2 µL de cada primer na concentração estoque de 10 µM.
2,6 µL de água MilliQ
1 µL de DNA do parasita
1µL do *pool* de DNA humano
O volume final da reação foi de 10µL.

O controle negativo nos testes de sensibilidade por PCR *Sybr Green* foi executado utilizando apenas o pool de DNA humano na concentração de 1.000 pg ao invés do DNA dos parasitas.

Para a realização dos testes de sensibilidade por qPCR *TaqMan*, foram utilizados o par de primers e a sonda que amplificam o gene do DNA satélite de *T. cruzi* com DNA da cepa CL Brener de *T. cruzi*, o par de primers e a sonda específicos para o gene da AAP3 de *Leishmania sp.*, foram testados com DNA da cepa *L. infantum* de *Leishmania sp.*, o par de primers e sonda com alvo no gene do rRNA 18S de *Plasmodium sp.*, foram testados com DNA de *P. falciparum*, e o par de primers e a sonda com alvo no gene B1 de *T. gondii*, foram testados com DNA de *T. gondii*. O DNA das cepas foi diluído em água Milli-Q na proporção 1/10, partindo de uma concentração inicial de 100 pg. Os testes foram realizados em duplicata para cada par de primers e sonda específica.

Dentro do sistema, foram pipetados em cada poço de reação da microplaca MicroAmp® Fast Optical com 96 poços:

5 µL do MIX *TaqMan* 2X (Life Technologies)
0,2 µL de cada primer na concentração estoque de 10 µM.
0,1 µL da sonda
3,5 µL de água MilliQ
1 µL de DNA do parasita
O volume final da reação foi de 10µL.

3.9 Avaliação da especificidade dos primers e sondas

O teste de especificidade avaliou a capacidade dos primers e sondas em amplificarem especificamente genes dos organismos alvo e a amplificação e hibridização cruzada com outros organismos com algum grau de homologia com o organismo alvo.

Para a avaliação cruzada de especificidade utilizando a qPCR *Sybr Green*, os primers que amplificam o gene do RNA ribossomal 28S de *Trypanosomatidae sp.* foram testados em triplicata utilizando o DNA das três cepas de *Leishmania sp.* Os primers que amplificam o gene do rRNA 18S de *Plasmodium sp.* foram testados em triplicata com DNA da cepa CL Brener de *T. cruzi*, *L. infantum* de *Leishmania sp.* e *T. gondii*, e os primers que amplificam o gene B1 de *T. gondii*, foram testados com DNA da cepa CL Brener de *T. cruzi*, *L. infantum* de *Leishmania sp.* e *P. falciparum*.

A avaliação da especificidade analítica dos produtos de amplificação foi realizada através da análise da curva de dissociação (formação de um pico único com a temperatura de *melting* esperada).

No ensaio de especificidade cruzada, foram pipetados em cada poço de reação da microplaca MicroAmp® Fast Optical com 96 poços:

5 µL do MIX *Sybr Green* (Life Technologies)

0,2 µL de cada primer na concentração estoque de 10 µM.

3,6 µL de água MilliQ

1 µL de DNA de cada um dos parasitas

O volume final da reação foi de 10µL.

Em cada sessão de qPCR *Sybr Green*, foi efetuado um controle negativo testado em triplicata para cada par de primers. O controle nestes testes foi executado com água Milli-Q ao invés de DNA dos parasitas.

Para execução do ensaio multiplex por qPCR *TaqMan*, os primers e sondas específicos para *T. cruzi* e *Leishmania sp.* e os oligos e sondas específicos para *Plasmodium sp.* e *T. gondii* foram testados em conjunto. Neste ensaio foram utilizados os DNAs de todas as diferentes cepas dos parasitas tanto individualmente quanto em combinações de dois a dois, sendo que o DNA de *T. cruzi* foi testado com o DNA de *Leishmania sp.*, utilizando os primers e sondas que amplificam a sequência satélite de *T. cruzi* e o gene da AAP3 de *Leishmania sp.* e o DNA de *P. falciparum* foi testado com o DNA de *T. gondii*, utilizando os primers e sondas que amplificam o gene do rRNA 18S de *Plasmodium sp.* e o gene B1 de *T. gondii*.

No ensaio multiplex, foram pipetados em cada poço de reação da microplaca MicroAmp® Fast Optical com 96 poços:

5 µL do MIX *TaqMan2X* (Life Technologies)

0,2 µL de cada primer na concentração estoque de 10 µM.

0,1 µL da sonda

2,2 μL de água MilliQ

1 μL de DNA de cada um dos parasitas

O volume final da reação foi de 10 μL .

Em cada sessão de qPCR *TaqMan*, foi efetuado um controle negativo testado em duplicata para cada par de primers. O controle nestes testes foi executado com água Milli-Q ao invés de DNA dos parasitas.

Após a pipetagem, as placas foram seladas e centrifugadas na centrífuga Eppendorf 5804R a 800 g por 1 min e levadas ao termociclador Step One Plus (Applied Biosystems) para que fosse realizada a amplificação e a detecção das curvas através do StepOne software versão 2.3.

4 RESULTADOS

4.1 PCR convencional

O protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* é derivado de múltiplas linhagens clonais, possuindo grande diversidade genética como resultado de sua propagação com pouca ou nenhuma troca genética entre as diferentes cepas. A amplificação de sequências gênicas distintas do miniéxon de *T. cruzi* indicam dimorfismos dentro das sequências repetitivas *in tandem*, gerando produtos com 300 ou 350 pb na amplificação de genes do miniéxon. No trabalho de Souto et al. (1996), cepas que geraram um produto de 300 pb foram classificadas como pertencentes ao grupo 1 ou TC1, e as cepas que geraram um produto de amplificação de 350 pb foram classificadas como pertencentes ao grupo 2 ou TC2.

Inicialmente realizamos a PCR convencional para determinar os marcadores que definem as linhagens filogenéticas com relação aos genes do miniéxon das cepas CL Brener, Y e G de *Trypanosoma cruzi*. Os três oligonucleotídeos utilizados neste experimento (Tabela 1), foram sintetizados de acordo com o trabalho de Souto et al. (1996), no qual foram desenhados três oligonucleotídeos com sequências distintas para amplificação específica de regiões do gene do miniéxon de *T. cruzi*, a fim de comprovar que existe diferença genética com relação aos genes do miniéxon entre diferentes cepas de *T. cruzi*. Dentre as diversas cepas testadas, a cepa G revelou um produto de 350 pb tendo sido classificada como pertencente ao grupo 2 (TC2) e as cepas Y e CL Brener revelaram um produto de 300 pb sendo classificadas no grupo 1 (TC1).

Estes oligonucleotídeos foram desenhados com base nas diferenças entre as regiões intergênicas para amplificar especificamente uma porção do gene do mini-éxon de *Trypanosoma cruzi*. O primer denominado PR440 que amplifica a região do espaçador intergênico não transcrito do mini-éxon de *T. cruzi*, é o oligonucleotídeo que corresponde à uma sequência única do grupo TC1. O primer denominado PR441 que amplifica a região intergênica spliced leader do mini-éxon de *T. cruzi*, corresponde à uma sequência única do grupo TC2. O primer PR442, que amplifica a região repetitiva spliced leader do mini-éxon de *T. cruzi*, é um oligonucleotídeo que corresponde a sequências conservadas e comuns aos grupos TC1 e TC2.

Em concordância com o descrito por Souto et al (1996), o experimento aqui realizado por PCR convencional confirmou a classificação das cepas CL Brener e Y no

grupo 1 e G no grupo 2 e corroborou a hipótese de que existe diferença filogenética com relação aos genes do miniéxon de *T. cruzi*, de acordo com a literatura científica, confirmando a seleção de cepas de grupos diferentes para integrar o painel de controles positivos para os testes de detecção molecular de *T. cruzi*. (figura 7).

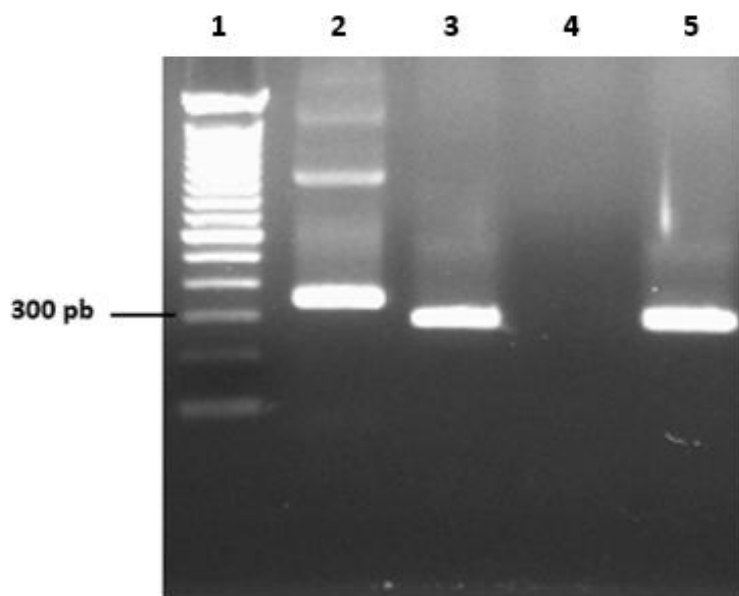


Figura 7. Análise dos produtos de amplificação da região intergênica do miniéxon das cepas G, CL Brener e Y de *T. cruzi*, realizada por PCR convencional e analisadas em gel de agarose 2,5%.1: Marcador de peso molecular 100 pb *ladder*.**2:** Produto de amplificação da cepa G de *T. cruzi*. **3:** Produto de amplificação da cepa CL Brener de *T. cruzi*.**4:** Produto de amplificação do controle negativo.**5:** Produto de amplificação da cepa Y de *T. cruzi*.

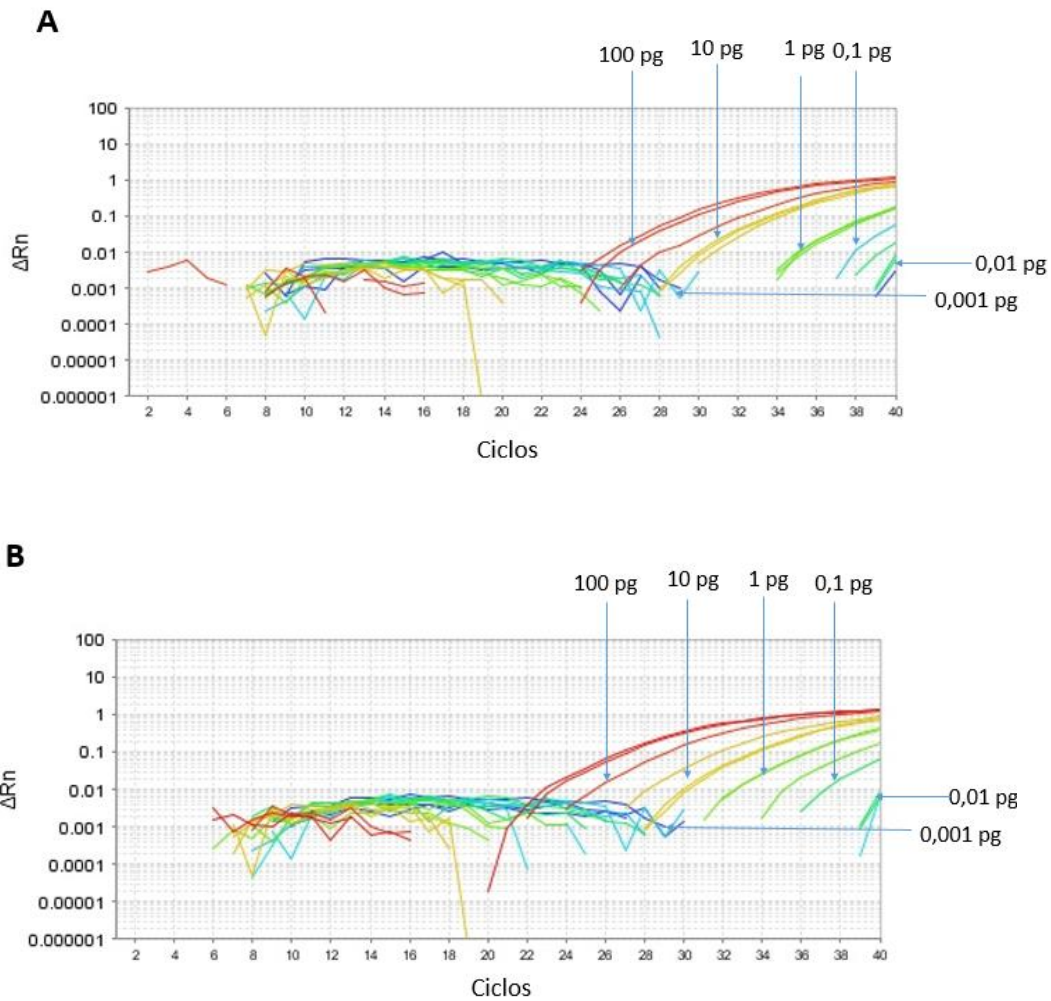
4.2 Sybr Green qPCR para a detecção de *T. cruzi* e *Leishmania sp.*

Depois de confirmar as linhagens filogenéticas com relação aos genes do miniéxon através da análise dos produtos de amplificação das cepas de *T. cruzi* utilizadas neste trabalho por PCR convencional, para desenvolver e validar o kit diagnóstico NAT, realizamos os testes por qPCR *Sybr Green* e por qPCR *TaqMan* com DNA de todas as cepas dos parasitas. Cada uma das etapas de PCR compreendeu a determinação da eficiência da técnica, na qual foi possível calcular o coeficiente de correlação e se houve ou não perda de linearidade na medida em que a concentração do DNA era alterada, mediante a realização das diluições do DNA alvo; a execução dos testes de determinação da menor concentração detectável de DNA, nos quais foram realizadas diluições seriadas do DNA dos parasitas e o DNA humano foi acrescentado às reações para simular as condições reais do teste; e a avaliação de especificidade, onde

a amplificação do DNA dos parasitas foi caracterizada pela curva de *melting* ou pela marcação fluorescente da sonda específica.

Como o gene do rRNA 28S é altamente conservado em tripanossomatídeos (ZHANG et al., 2016), determinamos a sensibilidade do teste, utilizando o par de primers com alvo no rRNA 28S de *Trypanosomatidae sp.*, por qPCR *Sybr Green* contra um painel de amostras positivas das cepas CL Brener, G e Y de *T. cruzi* e contra um *pool* de DNAs de humanos. Os sistemas de PCR com os primers em questão foram capazes de amplificar todos os representantes dos painéis de *T. cruzi*, contudo não amplificou DNA humano.

Em todas as três cepas testadas, a menor concentração detectável de DNA foi de 0,1 pg (0,005 parasitas/ μ L), a partir da concentração de 0,01 pg, os valores de C_T foram muito altos, sendo considerados negativos para amplificação. O controle negativo foi efetuado apenas com DNA humano (Figura 8).



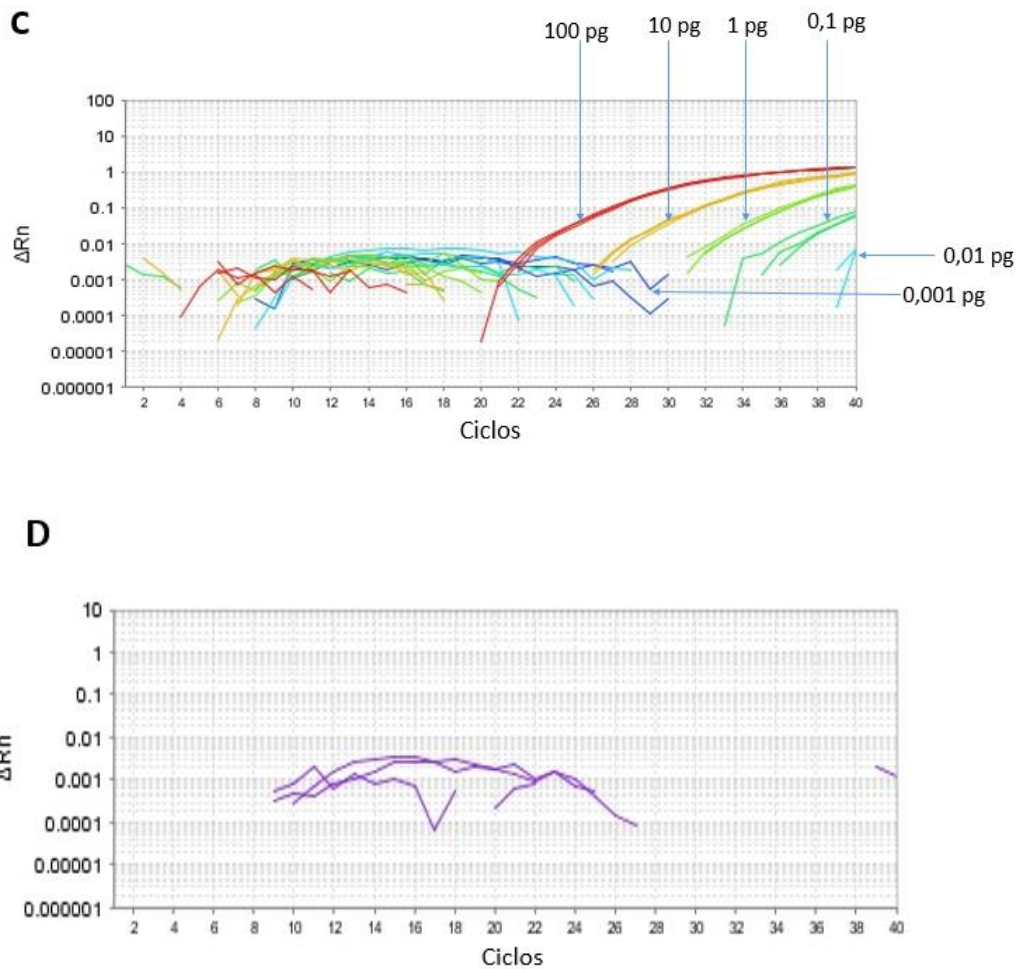


Figura 8. Teste de sensibilidade dos primers com alvo no gene do RNA ribossomal 28S de *Trypanosomatidae* sp. Análise do resultado dos testes de sensibilidade do par de primers com alvo no gene do RNA ribossomal 28S de *Trypanosomatidae* sp., através da curva gerada pelos produtos de amplificação das cepas CL Brener, Y e G de *T. cruzi* por qPCR *Sybr Green*. As concentrações do DNA estão indicadas por setas. **A.** Curvas de amplificação da cepa CL Brener. **B** Curvas de amplificação da cepa Y. **C.** Curvas de amplificação da cepa G. **D:** Análise dos produtos de amplificação gerados pelo controle negativo com o par de primers com alvo no gene do RNA ribossomal 28S de *Trypanosomatidae* sp. utilizando 1.000 pg de DNA humano ao invés do DNA de *T. cruzi*.

Para confirmar a especificidade deste par de primers, bem como a capacidade de amplificar o gene do rRNA 28S também das cepas de *Leishmania* sp., realizamos o teste com DNA de *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* na concentração de 1.000 pg. Os amplicons gerados para os diferentes parasitas testados apresentaram diferenças sutis que não permitiram determinar com segurança uma *temperatura de melting* característica para cada isolado através de elaboração de curvas de dissociação (*melting curve*) convencionais (Figura 9). Como esperado, estes resultados comprovam que o rRNA 28S é um gene conservado em todos os tripanossomatídeos (ZHANG et al. 2016).

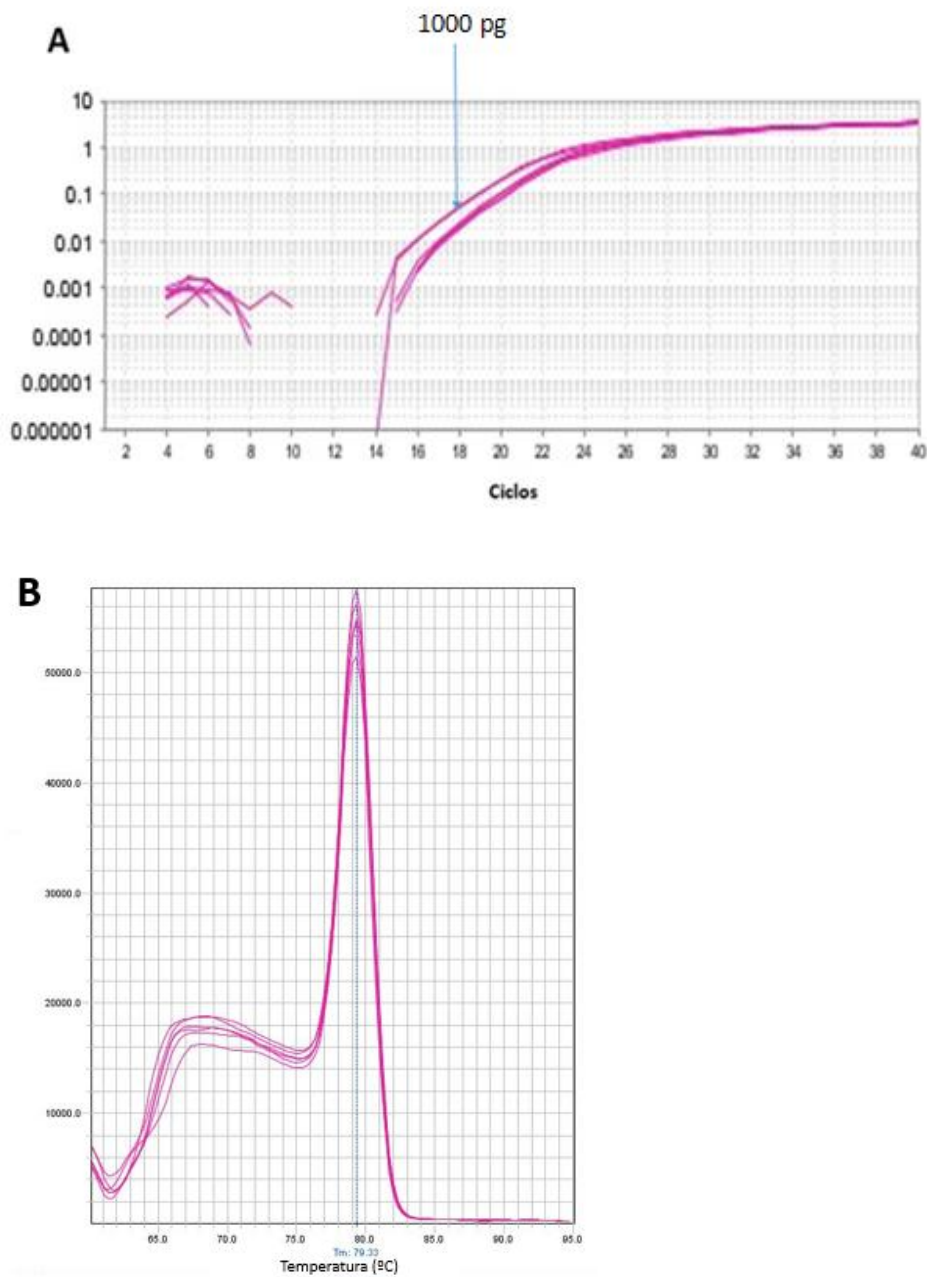
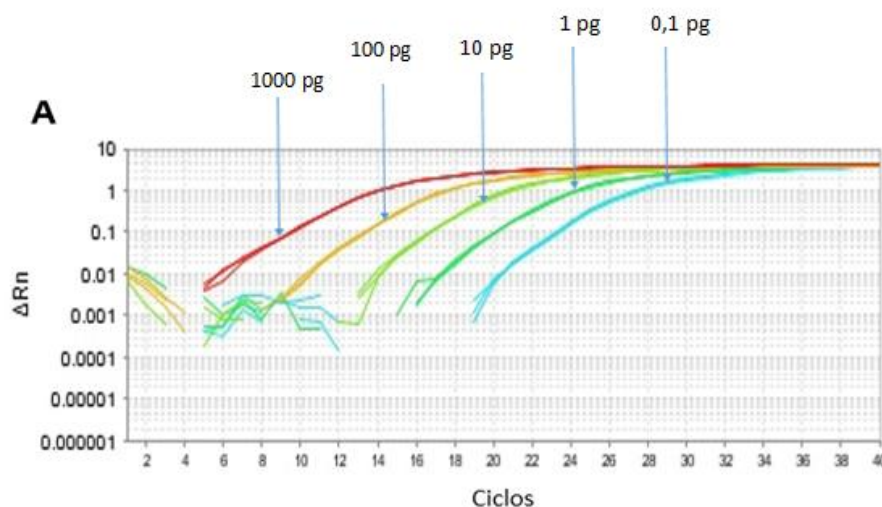


Figura 9. Avaliação de especificidade dos primers com alvo no RNA ribossomal 28S de *Trypanosomatidae sp* utilizando DNA de *Leishmania sp.* **A:** Análise do teste da avaliação de especificidade mostrando a curva de amplificação com DNA das cepas *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* na concentração de 1000 pg utilizando o par de primers com alvo no RNA ribossomal 28S de *Trypanosomatidae sp.* **B:** Curva de dissociação (melting) dos primers com alvo no RNA ribossomal 28S de *Trypanosomatidae sp.*, com DNA das cepas de *Leishmania sp.*, os produtos de amplificação apresentaram uma T_M de 80°C.

Os primers que possuem como alvo a sequência satélite do DNA de *T. cruzi* foram desenhados com base nos trabalhos de Duffy et al. (2013) e Melo et al. (2015), nos quais os autores descrevem que o procedimento de detecção do DNA satélite de *T.*

cruzi com sondas fluorogênicas (*TaqMan*) revelou alta sensibilidade e especificidade. Os primers com alvo no gene da aminoácido permease 3 (AAP3) de *Leishmania sp.*, foram desenhados de acordo com o trabalho de Tellevik et al. (2014), utilizando sondas fluorogênicas (qPCR *TaqMan*) com alvo numa região de 74 pb do gene de *L.(L.) major* que codifica um transportador de arginina (AAP3). Neste estudo, a procura no banco de dados global (BLAST) pela região de 74pb onde os primers e as sondas se ligam, indicaram a geração de sinais positivos do ensaio quando o alvo era o DNA de espécies de *Leishmania*.

A determinação da linearidade do teste consiste na manutenção constante da eficiência proporcional ao aumento da concentração do DNA, com isso, num ensaio de eficiência com valor igual a 100%, o DNA duplica uma vez em cada ciclo ou 10 vezes a cada 3,32 ciclos, assim, curvas padrão com declives inferiores a -3,3 possuem perda de eficiência à medida que a concentração da amostra aumenta (ZHANG et al. 2015). Avaliando as reações de PCR frente a diversas concentrações de DNA realizadas com os pares de primers com alvo na sequência satélite do DNA de *T. cruzi*, o resultado do teste de eficiência foi de 96,9% e a cepa de escolha foi CL Brener por possuir característica híbrida. O teste de eficiência dos pares de primers com alvo no gene da AAP3 de *Leishmania sp.* resultou em 101,1% e foi realizado com DNA da cepa *L. infantum*, que é o agente causador da leishmaniose visceral, sendo por isso, considerada de maior interesse para triagem de doadores de sangue (Figura 10).



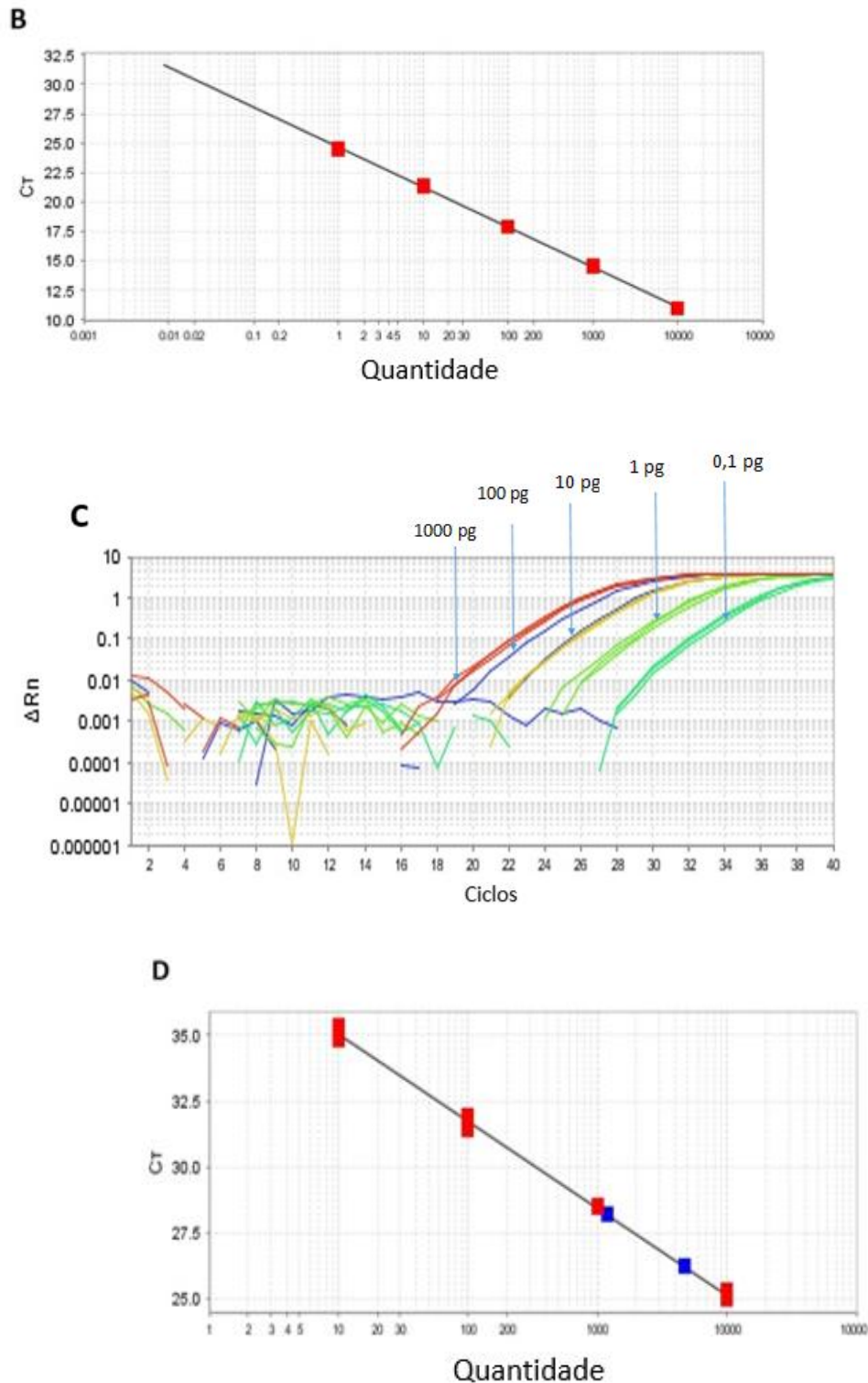
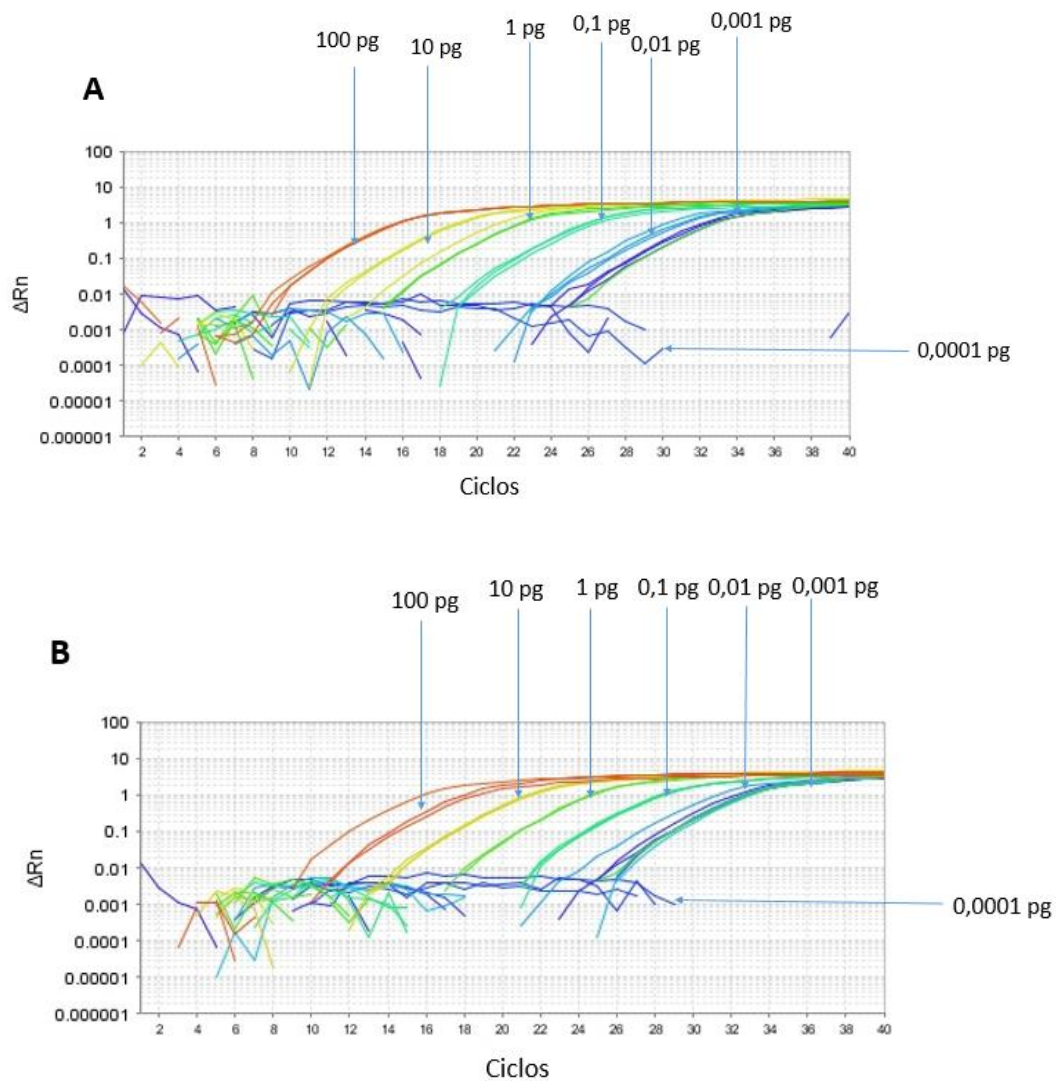


Figura 10. Teste de eficiência e curva padrão dos primers com alvo no gene da sequência satélite do DNA de *Trypanosoma cruzi* dos primers com alvo no gene da AAP3 de *Leishmania*.A: Resultado do teste de eficiência mostrando a curva gerada pelos produtos de amplificação do par de primers com alvo no gene da sequência satélite do DNA de *Trypanosoma cruzi* testados com DNA da cepa CL Brener.**B:**Curva padrão do teste de eficiência do par de primers com alvo no geneda sequência satélite do DNA de *Trypanosoma cruzi* testado com DNA da cepa CL Brener, resultando em 96,9%.**C:** Resultado do teste de eficiência mostrando a curva gerada pelos produtos de amplificação do par de primers com alvo

no gene da AAP3 de *Leishmania* utilizando o DNA de *L. infantum*.**D:** Curva padrão do teste de eficiência do par de primers com alvo no gene da AAP3 de *Leishmania* utilizando o DNA de *L. infantum*, resultando em 101,1%.

A figura 11 mostra os testes de sensibilidade com o par de primers que possui como alvo o gene da sequência satélite de *T. cruzi*, utilizando DNA de todas as cepas (G, Y e CL Brener). Neles observamos que até a concentração de 0,001 pg de DNA houve sinal positivo de amplificação com valores baixos de C_T e a partir da concentração de 0,0001 pg o sinal de amplificação foi totalmente negativo. O DNA humano foi acrescido aos testes e o controle negativo foi realizado com DNA humano na concentração de 1.000 pg.



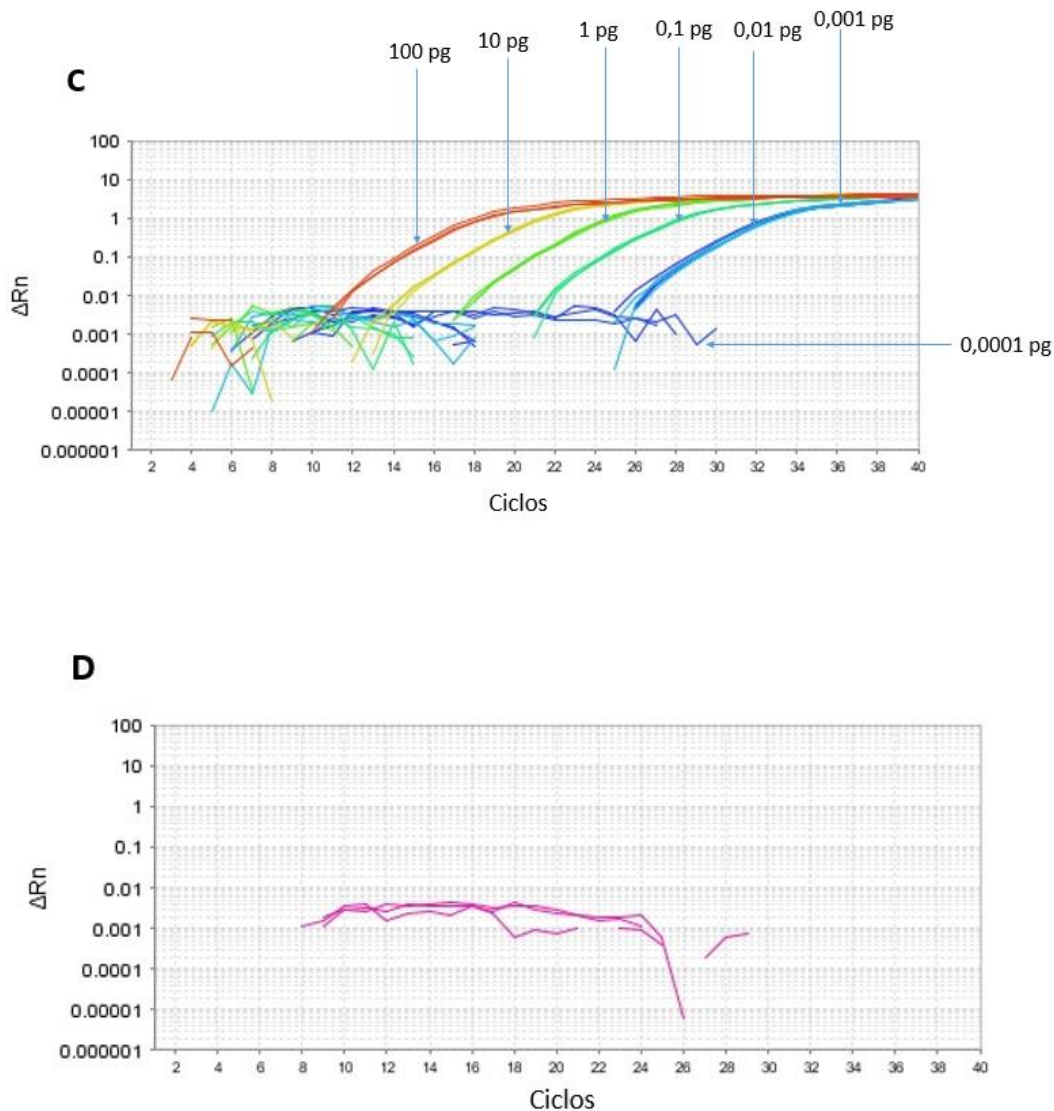
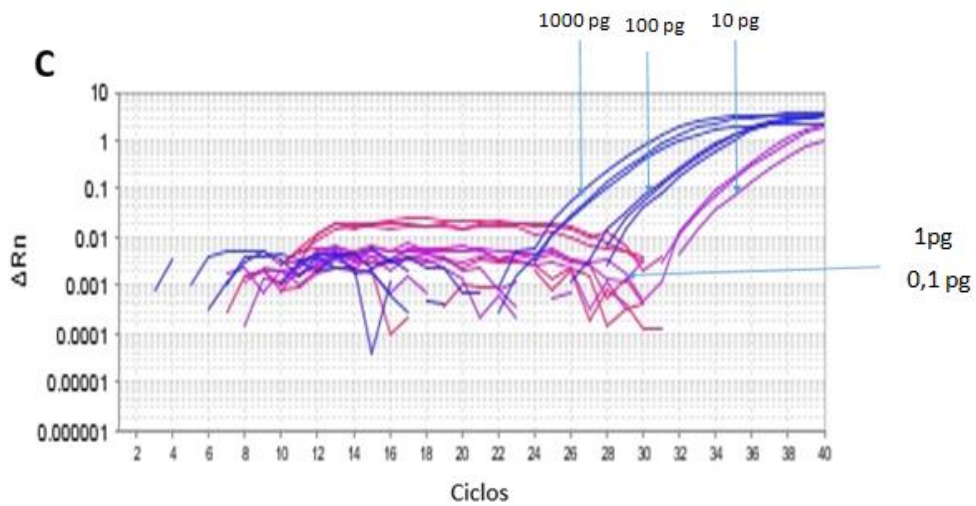
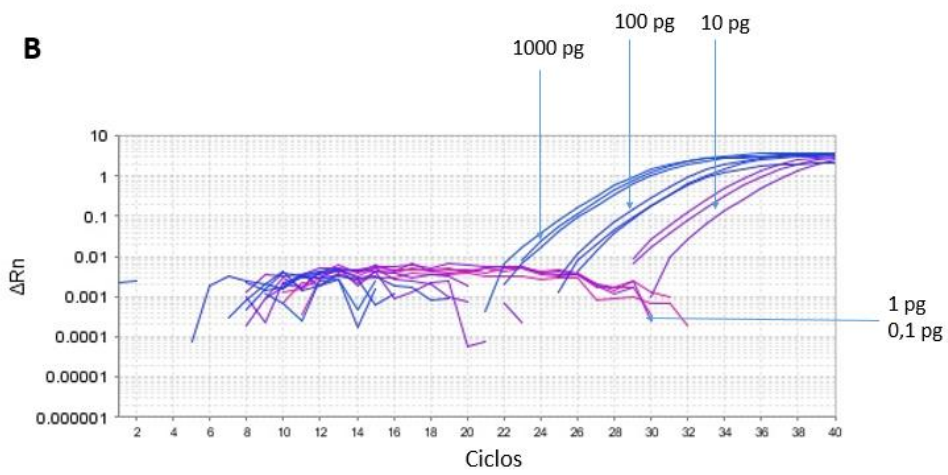
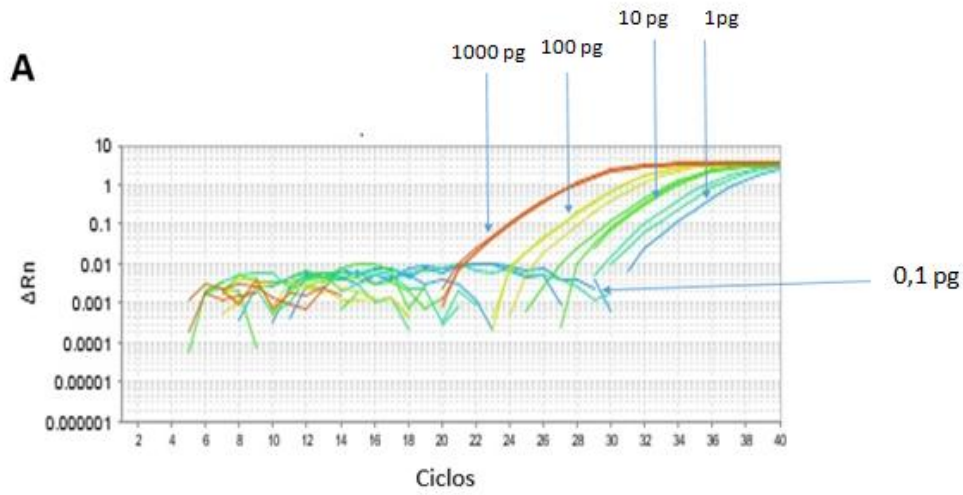


Figura 11. Teste de sensibilidade dos primers com alvo no gene da sequência satélite de *T. cruzi*. **A:** Análise do resultado da avaliação de sensibilidade do par de primers com alvo no gene da sequência satélite de *T. cruzi*, utilizando DNA das cepas G, Y e CL Brener. As concentrações de DNA das três cepas testadas estão indicadas pelas setas. **A.** Produtos de amplificação da cepa CL Brener. **B.** Produtos de amplificação da cepa Y. **C.** Produtos de amplificação da cepa G. **D:** Análise dos produtos de amplificação do controle negativo gerados pelo par de primers com alvo no gene da sequência satélite de *T. cruzi*, utilizando 1000 pg de DNA humano ao invés do DNA do parasita.

Para determinar a sensibilidade do par de primers com alvo no gene da aminoácido permease 3 (AAP3) de *Leishmania sp.*, testado com DNA das cepas *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, verificamos que houve sinal positivo de amplificação com valores mais baixos de C_T em todas as concentrações testadas, exceto nas concentrações de 0,1 pg de *L. infantum* e nas concentrações de 1 pg e 0,1 pg de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, nas quais os sinais de amplificação foram totalmente negativos. O controle negativo foi realizado com DNA humano na concentração de 1.000 pg (Figura 12).



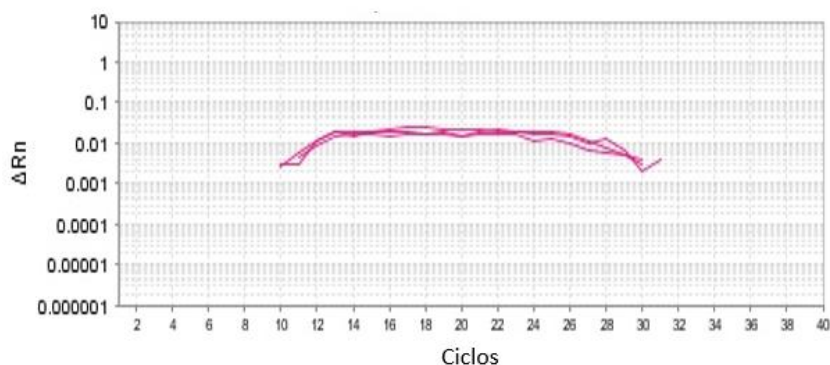
D

Figura 12. Teste de sensibilidade dos primers com alvo no gene da AAP3 de *Leishmania sp.* Análise do resultado dos testes de sensibilidade por meio da avaliação das curvas dos produtos de amplificação do DNA das cepas *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, utilizando o par de primers que amplificam o gene da AAP3 de *Leishmania sp.*. As concentrações do DNA do parasita estão indicadas pelas setas. **A.** produtos de amplificação da cepa *L. infantum*. **B.** Produtos de amplificação da cepa *L. amazonensis*. **C.** Produtos de amplificação da cepa *L. braziliensis*. **D:** Análise da curva gerada pelos produtos de amplificação do controle negativo, com o par de primers com alvo no gene da AAP3 de *Leishmania sp.*, no qual foi utilizado 1.000 pg de DNA humano ao invés do DNA das cepas de *Leishmania sp.*

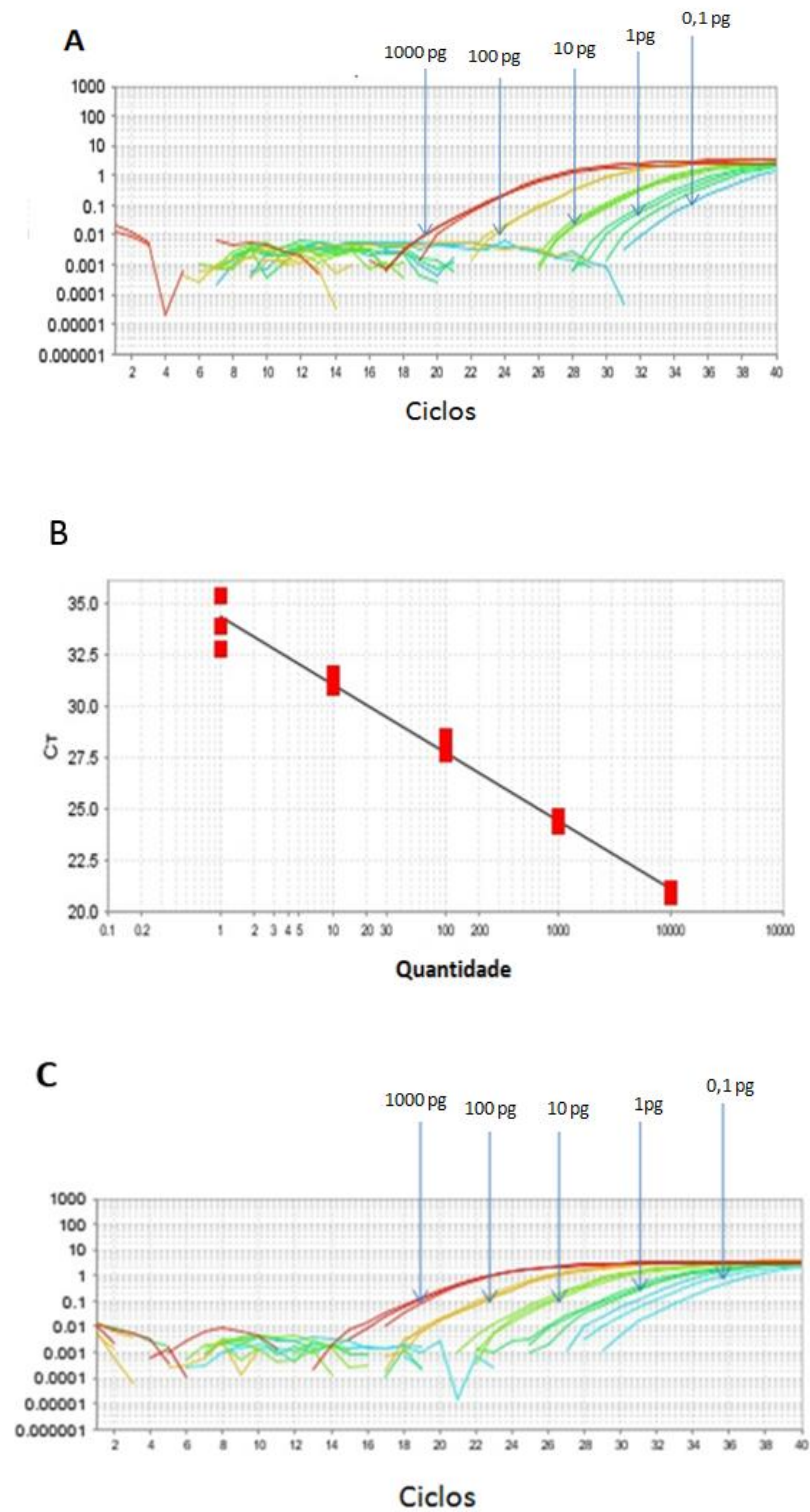
4.3 Sybr Green qPCR para a detecção de *Plasmodium sp.* e *T. gondii*

Para detecção de amplificação do DNA de *Plasmodium sp.*, Rougemont et al. (2004) desenharam primers com alvo na região conservada do gene do rRNA 18S de *Plasmodium sp.*, estes primers são internamente polimórficos o suficiente para possibilitar o desenho de quatro sondas espécie-específicas para as espécies *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie* e *P. ovale*. Os primers utilizados nos testes foram desenhados com base neste trabalho.

De acordo com LIN et al. (2000), o gene B1 é um dos genes mais conservados entre as diferentes cepas de *T. gondii*. Neste estudo, os autores desenvolveram uma técnica baseada na qPCR TaqMan para a detecção quantitativa de *T. gondii*. Demonstraram que a técnica é sensível, detectando até 0,05 parasitas por reação e altamente reprodutível em diferentes espécimes clínicos. Foi com base neste experimento que desenhemos os primers e sondas com alvo no gene B1 de *T. gondii*.

O teste de eficiência com diluições seriadas do DNA de *P. falciparum* utilizando os pares de primers com alvo no gene do rRNA 18S de *Plasmodium sp.* resultou em 100,6% e o teste com DNA de *T. gondii* utilizando os primers com alvo no gene B1 de *T. gondii* resultou numa eficiência de 103,1%. Em todos os testes de

eficiência os valores foram aceitáveis, pois se mantiveram próximos de 100%, o que denota que não houve perda de linearidade a medida em que a concentração de DNA foi alterada através das diluições seriadas (figura 13).



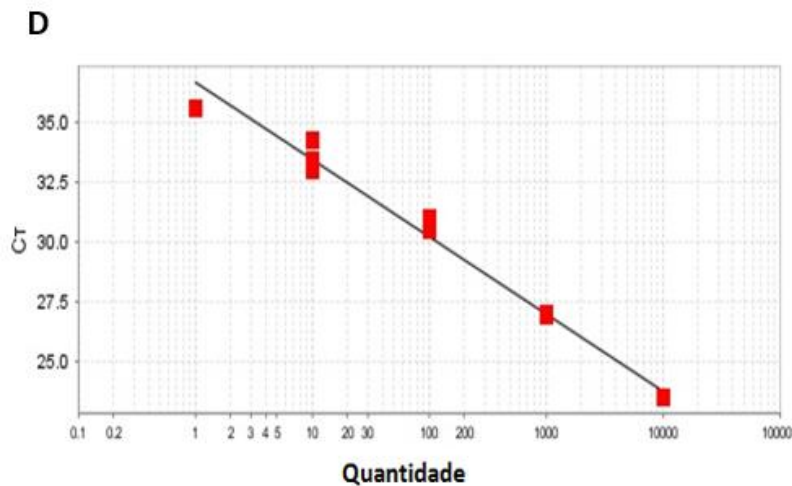
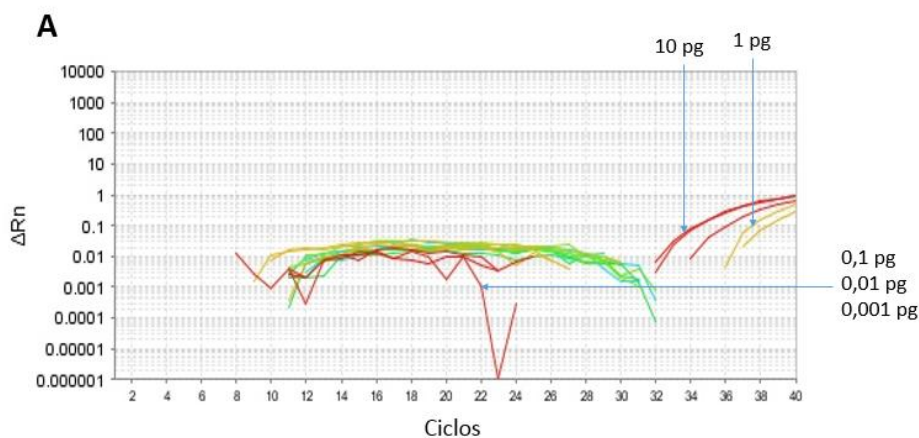


Figura 13. Teste de eficiência e curva padrão dos primers com alvo no gene do rRNA 18S de *Plasmodium sp.* e do gene B1 de *Toxoplasma gondii*. **A:** Resultado do teste de eficiência mostrando a curva gerada pelos produtos de amplificação do par de primers com alvo no gene do rRNA 18S de *Plasmodium* testados com DNA de *P. falciparum*, as concentrações do DNA estão indicadas pelas setas. **B:** Curva padrão do teste de eficiência do par de primers com alvo no gene do rRNA 18S de *Plasmodium*, resultando em eficiência de 100,6%. **C:** Resultado do teste de eficiência mostrando a curva gerada pelos produtos de amplificação dos pares de primers com alvo no gene da B1 de *Toxoplasma gondii* utilizando o DNA de *T. gondii*, em concentrações decrescentes indicadas por setas. **D:** Curva padrão do teste de eficiência do par de primers com alvo no gene B1 de *Toxoplasma gondii*, resultando em 103,1% de eficiência.

Realizamos o teste de sensibilidade para determinar a menor concentração detectável de DNA, utilizando o par de primers com alvo no gene do rRNA 18S de *Plasmodium* e com o par de primers com alvo no gene B1 de *T. gondii*. Com DNA de *P. falciparum*, o limite foi de 1 pg e com DNA de *T. gondii* foi de 10 pg. Em todos os testes e no controle negativo foi acrescido o DNA humano na concentração de 1.000 pg (Figura 14).



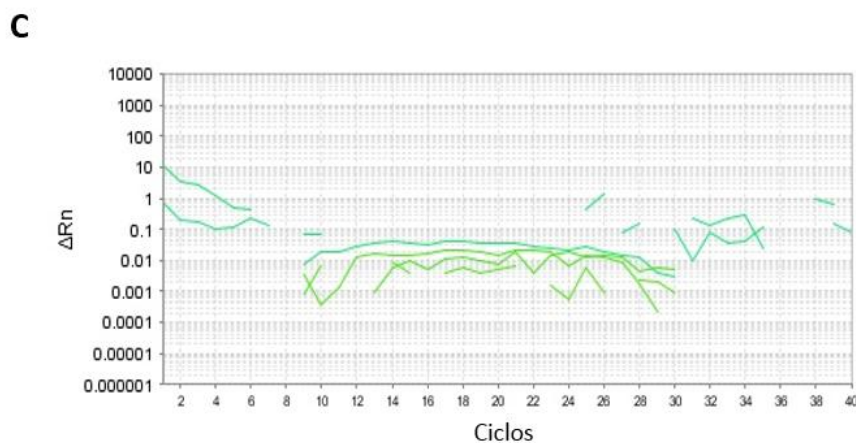
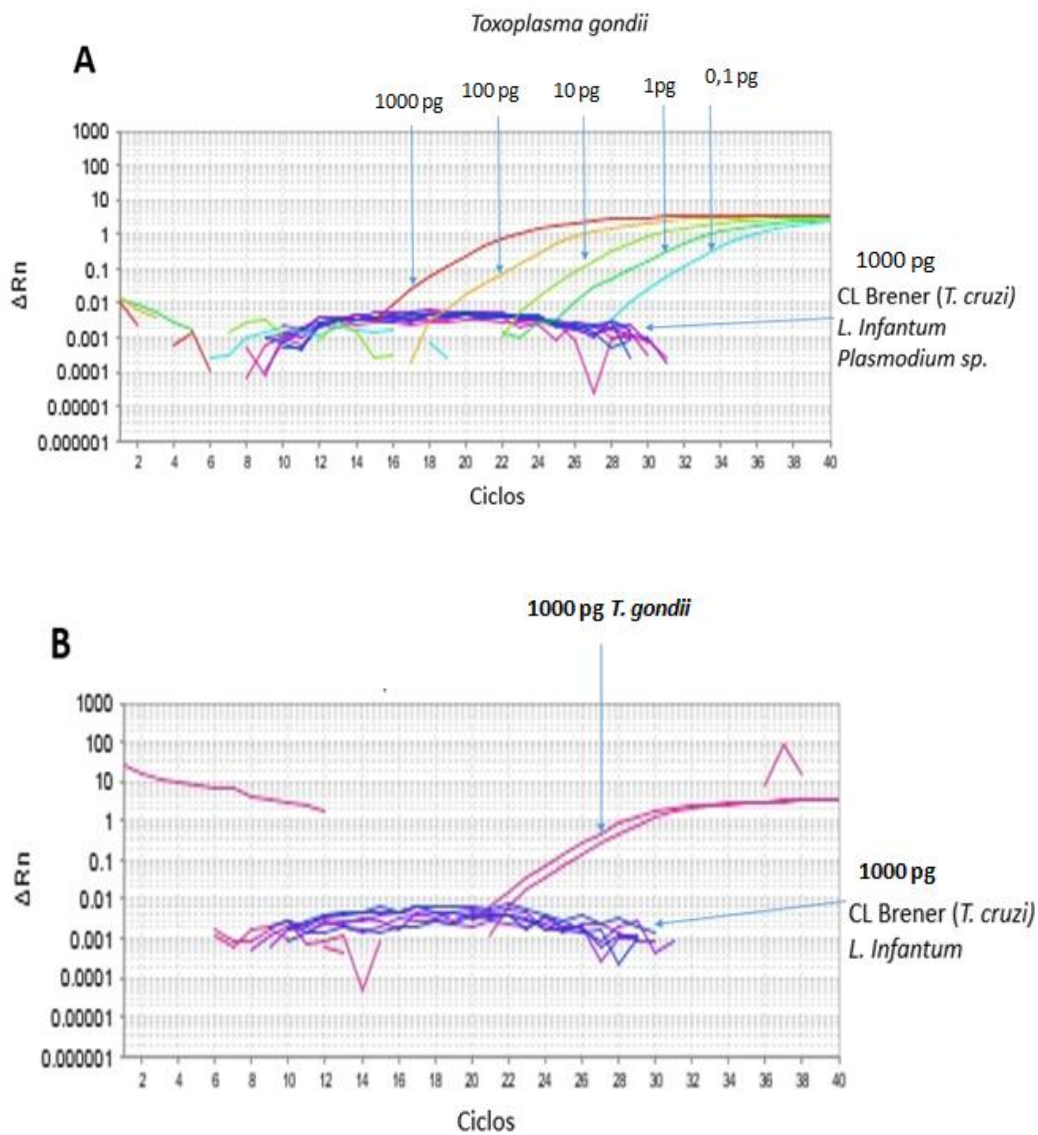


Figura 14. Teste de sensibilidade dos primers com alvo no gene do rRNA 18S de *Plasmodium sp.* e no gene B1 de *T. gondii*. Análise do resultado dos testes de sensibilidade por meio da avaliação das curvas dos produtos de amplificação do DNA de *P. falciparum*, utilizando o par de primers que amplificam o gene do rRNA 18S de *Plasmodium sp.* e do DNA de *T. gondii*, com o par de primers que amplificam o gene B1 de *T. gondii*. As concentrações do DNA dos parasitas estão indicadas pelas setas. **A.** Produtos de amplificação de *P. falciparum*. **B.** Produtos de amplificação de *T. gondii*. **C.** Análise da curva gerada pelos produtos de amplificação do controle negativo, com o par de primers com alvo no gene do rRNA 18S de *Plasmodium sp.* e no gene B1 de *T. gondii*, no qual foram utilizados 1000 pg de DNA humano ao invés do DNA dos parasitas.

Para determinar a especificidade, realizamos os testes dos primers com alvo no gene B1 de *T. gondii* com o DNA da cepa CL Brener de *T. cruzi*, *L. infantum* de *Leishmania sp.* e *P. falciparum* e dos primers com alvo no rRNA 18S de *Plasmodium sp.* com DNA da cepa CL Brener de *T. cruzi*, *L. infantum* de *Leishmania sp.* e *T. gondii*. Pelos resultados das curvas de amplificação, verificamos que houve sinal positivo com valor baixo de C_T apenas no teste do DNA de *T. gondii*, utilizando os primers com alvo no gene do rRNA ribossomal 18S de *Plasmodium sp.*, nos demais testes não ocorreu qualquer sinal positivo de amplificação, confirmando que estes primers são específicos para a amplificação do DNA dos organismos alvos (Figura 11).

Nos ensaios de avaliação cruzada de especificidade utilizando os pares de primers com alvo no rRNA 18S de *Plasmodium sp.* e com alvo no gene B1 de *T. gondii*, ficou constatado que o DNA de *T. gondii* é amplificado na presença do par de primers que amplifica o gene do rRNA 18S. Através de confirmação por meio do banco de dados Nucleotide Blast (NCBI), este par de primers amplifica o gene do rRNA 18S de *Plasmodium sp.* e de *T. gondii*, gerando sinais positivos na presença de DNA de ambos os parasitas. Não foi possível estabelecer diferenciação entre os dois parasitas através da curva de *melting*, uma vez que a mesma gerou picos coincidentes na temperatura aproximada de 77°C (Figura 15).



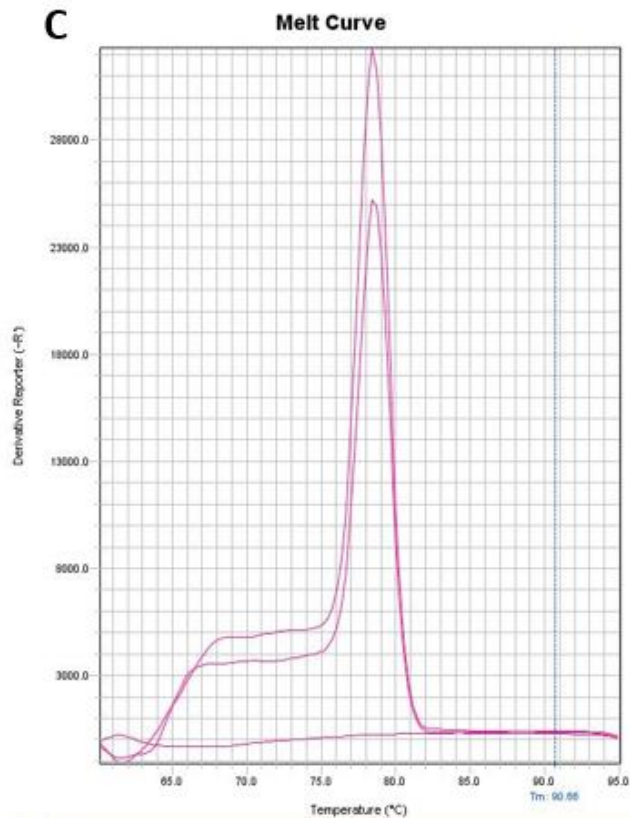


Figura 15. Avaliação cruzada de especificidade dos primers com alvo no RNA ribossomal 18S de *Plasmodium sp* e no gene B1 de *T. gondii*. **A:** Análise do teste da avaliação cruzada de especificidade mostrando a curva de amplificação com todas as diluições do DNA de *T. gondii* e a ausência de sinal positivo com a cepa CL Brener de *T. cruzi*, *L. infantum* de *Leishmania sp.* e *P. falciparum* na concentração de 1000 pg utilizando o par de primers com alvo no gene B1 de *T. gondii*. **B:** Análise do teste da avaliação cruzada de especificidade mostrando a ausência de sinal positivo com DNA das cepas CL Brener de *T. cruzi*, *L. infantum* de *Leishmania* e as curvas de amplificação geradas com DNA de *T. gondii* na concentração de 1000 pg utilizando o par de primers com alvo no RNA ribossomal 18S de *Plasmodium sp.* **C:** Curva de melting dos produtos de amplificação gerados por *T. gondii* com os primers com alvo no gene do rRNA 18S de *Plasmodium sp*, mostrando um pico de temperatura de 77°C.

4.4 *TaqMan* qPCR para a detecção de *T. cruzi* e *Leishmania sp*

Conjuntos de primers e sondas marcadas com fluorocromos específicos para cada espécie foram usados como uma metodologia alternativa ao uso do *Sybr Green*. Em testes preliminares utilizando a PCR em tempo real com sondas fluorogênicas *TaqMan* determinamos que para os pares de primers com alvo no DNA satélite de *T. cruzi* e com alvo no gene da AAP3 de *Leishmania sp.*, a temperatura ótima de degradação das sondas pela Taq DNA polimerase foi de 57°C. Verificamos que para todos os primers e sondas testados não houve sinal positivo de amplificação com DNA

humano e nem com o controle negativo, no qual foi utilizado apenas água Milli-Q ao invés do DNA das cepas dos parasitas.

A partir disto, realizamos a qPCR *TaqMan* com sondas fluorogênicas para determinar a sensibilidade dos primers e sondas. Utilizamos os primers e a sonda com alvo no DNA satélite de *T. cruzi*, com DNA da cepa CL Brener. De acordo com Duffy et al. 2013 e Melo et al. 2015, uma sensibilidade maior na qPCR *TaqMan* foi esperada em comparação com a qPCR *Sybr Green*, por isso, testamos 7 diluições partindo de uma concentração de 100 pg de DNA do parasita. Pelos resultados, notamos que a PCR para *T. cruzi* baseada no sistema *TaqMan* foi capaz de amplificar concentrações de DNA superiores a 0,001 pg. (Figura 16).

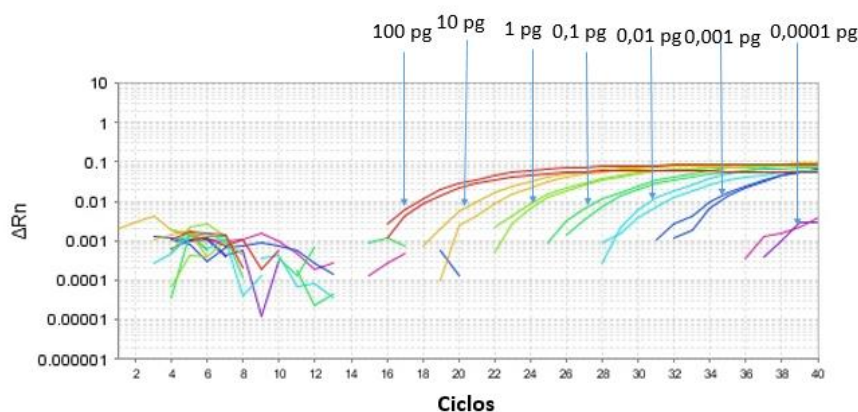


Figura 16: Teste de sensibilidade por PCR em tempo real *TaqMan* dos primers e sonda com alvo na sequência satélite do DNA de *T. cruzi*. Análise dos resultados obtidos através das curvas de amplificação do DNA da cepa CL Brener, utilizando os pares de primers e sonda fluorogênica específica para a sequência satélite do DNA de *T. cruzi*. As concentrações do DNA do parasita estão indicadas pelas setas.

Testamos também com relação à sensibilidade os primers e a sonda com alvo em um gene conservado em todas as espécies, o gene da AAP3 de *Leishmania sp.*, utilizando o DNA da cepa *L. infantum*. Neste experimento constatamos que as sondas específicas foram capazes de amplificar concentrações superiores a 1 pg de DNA (Figura 17).

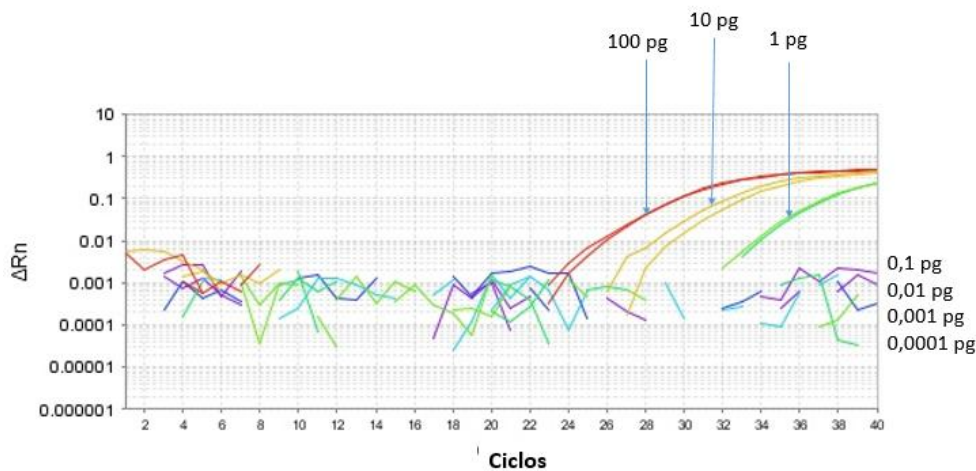
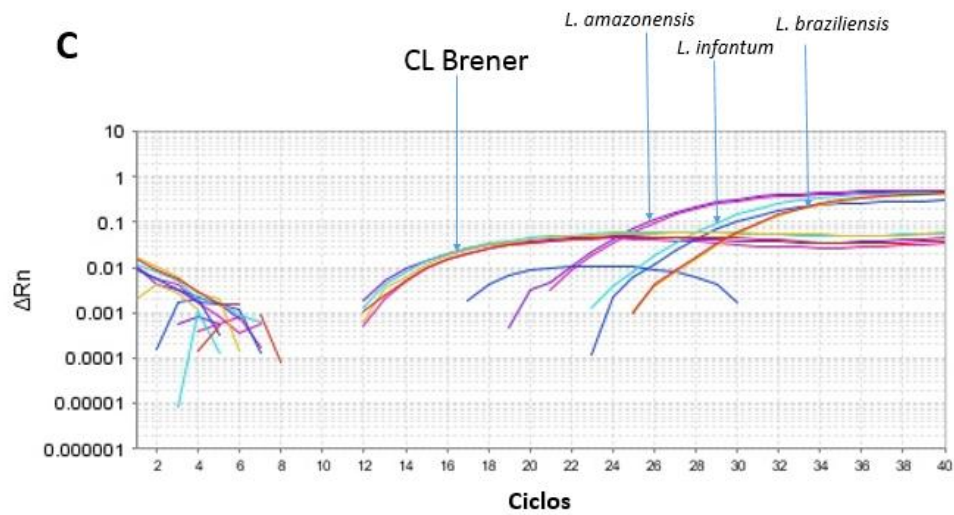
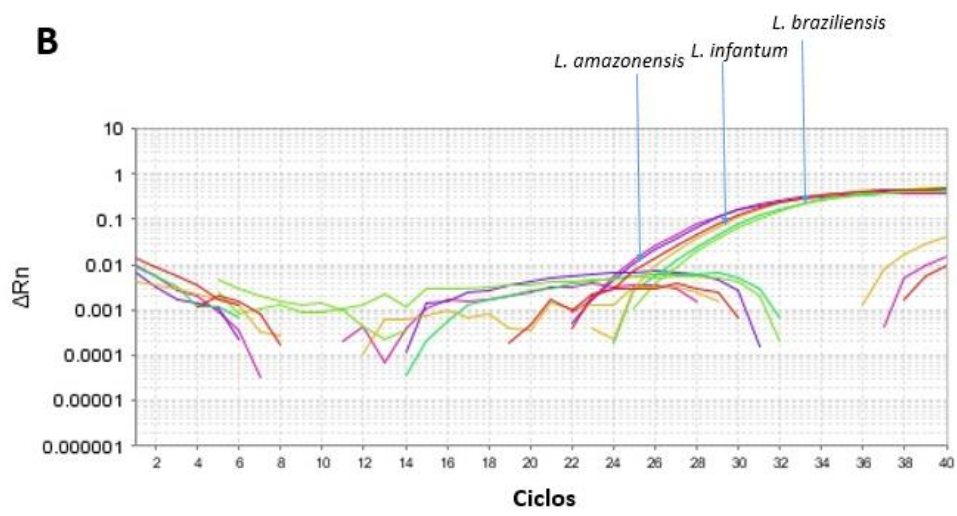
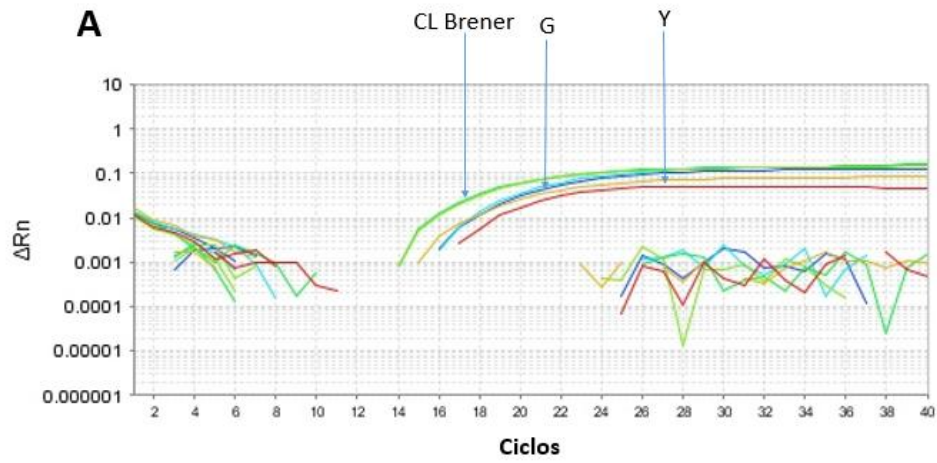


Figura 17: Teste de sensibilidade por PCR em tempo real *TaqMan* dos primers e sonda com alvo no gene da AAP3 de *Leishmania sp.* Análise dos resultados obtidos através das curvas de amplificação do DNA da cepa *L. infantum*, utilizando os pares de primers e sonda fluorogênica específica para o gene da AAP3 de *Leishmania sp.* As concentrações do DNA do parasita estão indicadas pelas setas.

Com o propósito de determinar a especificidade das sondas, realizamos o teste multiplex utilizando os primers e sondas que amplificam a sequência satélite do DNA de *T. cruzi* e o gene da AAP3 de *Leishmania sp.* Neste experimento, todas as cepas de *T. cruzi* e de *Leishmania sp.* foram testadas individualmente e em conjunto. No teste com DNA individual das cepas de *T. cruzi* e *Leishmania sp.*, verificamos que houve sinal positivo de amplificação na concentração de 1000 pg de DNA e no teste em combinação de dois a dois das cepas entre si, houve sinal duplamente positivo, pois ambos os DNAs estavam presentes na concentração de 1.000 pg (Figura 18).

No ensaio com os primers e as sondas específicos para amplificação da sequência satélite de *T. cruzi* e do gene da AAP3 de *Leishmania sp.* com DNA das três cepas de *T. cruzi* utilizadas individualmente, os valores de C_T ficaram entre 14 e 16. No ensaio com DNA das três cepas de *Leishmania sp.* testadas também individualmente, os valores de C_T se situaram entre 22 e 24 ciclos. Os testes com DNA das três cepas de *T. cruzi* e *Leishmania sp.* combinadas entre si com os mesmos primers e sondas revelaram que houve sinal duplamente positivo e foi possível diferenciar o sinal de *T. cruzi* do sinal de *Leishmania sp.*, uma vez que os diferentes valores de C_T obtidos no teste individual foram mantidos para ambas os parasitas no teste em conjunto.



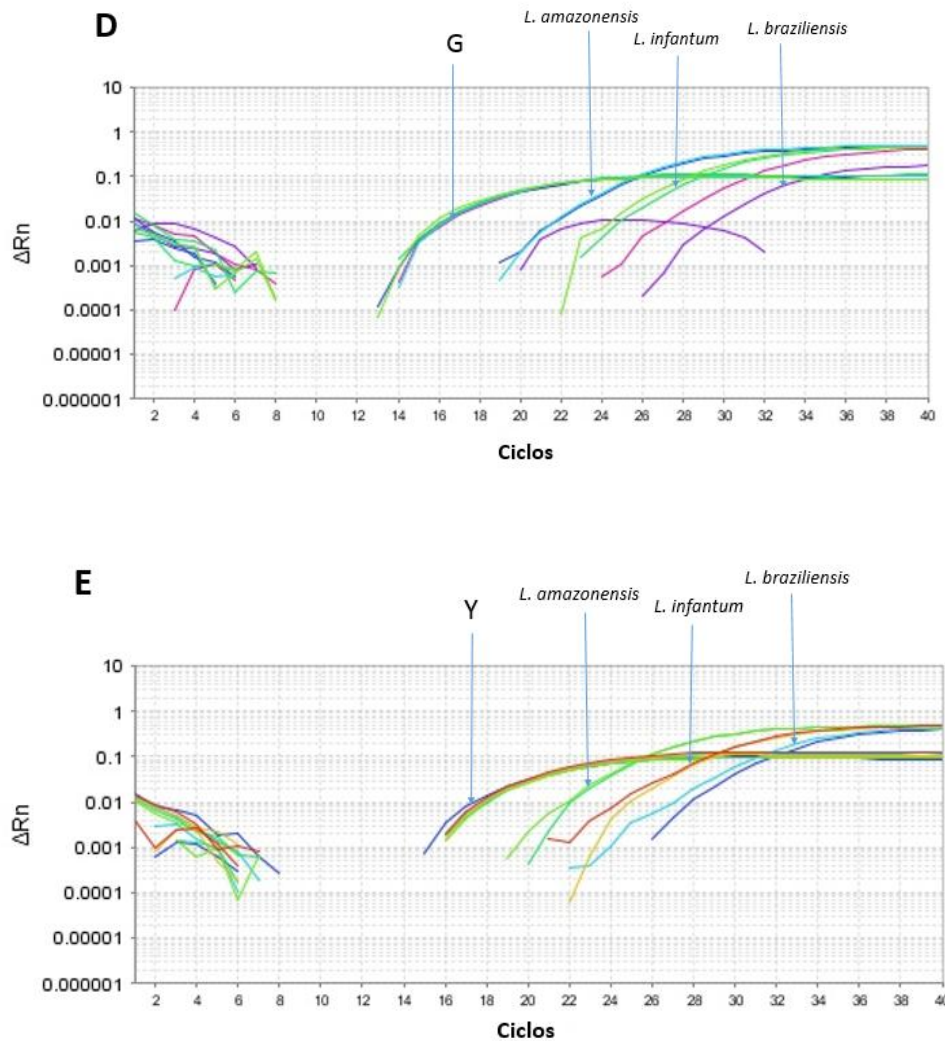


Figura 18: Avaliação de especificidade por teste multiplex utilizando a PCR em tempo real TaqMan com DNA de *T. cruzi* e *Leishmania sp.* Análise de especificidade dos primers e sondas com alvo no DNA satélite de *T. cruzi* e no gene da AAP3 de *Leishmania sp.* **A.** Curvas de amplificação geradas pelos produtos do DNA individual das cepas CL Brener, G e Y de *T. cruzi*, com os primers e a sonda específicos para a sequência satélite do DNA de *T. cruzi* e o gene da AAP3 de *Leishmania sp.* **B.** Curvas de amplificação geradas pelos produtos do DNA individual das cepas *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. braziliensis*, com os primers e sonda específicos para o gene da AAP3 de *Leishmania sp.* e a sequência satélite do DNA de *T. cruzi*. **C.** Curvas de amplificação do DNA da cepa CL Brener de *T. cruzi* utilizado em conjunto com o DNA das cepas *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. braziliensis*, utilizando os primers e sondas específicos para a sequência satélite do DNA de *T. cruzi* e para o gene da AAP3 de *Leishmania sp.* **D.** Curvas de amplificação do DNA da cepa G de *T. cruzi* utilizado em conjunto com o DNA das cepas *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. braziliensis*, utilizando os primers e sondas específicos para a sequência satélite do DNA de *T. cruzi* e para o gene da AAP3 de *Leishmania sp.* **E.** Curvas de amplificação do DNA da cepa Y de *T. cruzi* utilizado em conjunto com o DNA das cepas *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. braziliensis*, utilizando os primers e sondas específicos para a sequência satélite do DNA de *T. cruzi* e para o gene da AAP3 de *Leishmania sp.*

4.5 TaqMan qPCR para a detecção de *Plasmodium sp.* e *T. gondii*

Em testes preliminares, determinamos que para os pares de primers com alvo no gene do rRNA 18S de *Plasmodium sp.* e com alvo no gene B1 de *T. gondii*, a temperatura ótima de ação da Taq polimerase nas sondas foi de 62°C. Observamos também que para todos os primers e sondas testados não houve sinal positivo de amplificação com DNA humano e nem com o controle negativo, no qual foi utilizado apenas água Milli-Q ao invés do DNA dos parasitas.

No teste de determinação do limite de detecção ou sensibilidade, com DNA de *P. falciparum*, utilizando os primers e a sonda com alvo no rRNA 18S de *Plasmodium sp.*, houve sinal positivo com valores mais baixos de C_T somente até a concentração de 1 pg de DNA (Figura 19).

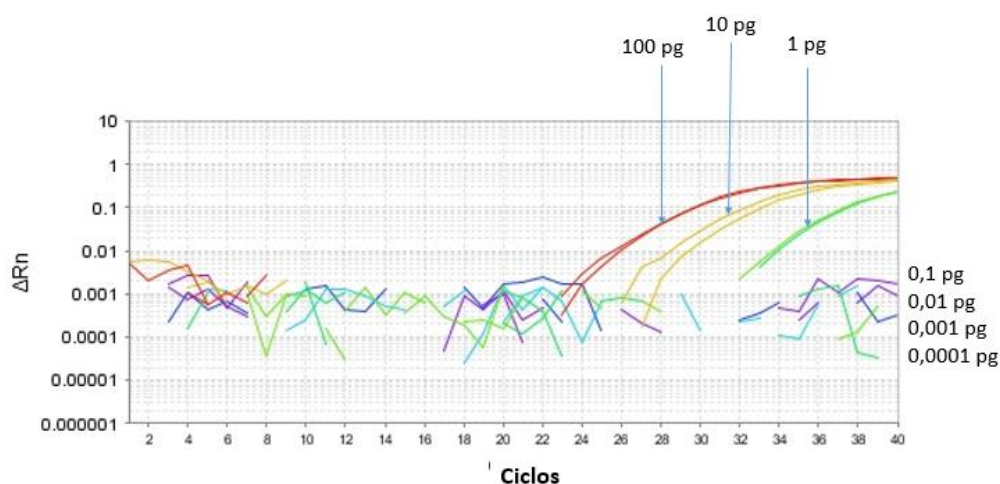


Figura 19: Teste de sensibilidade por PCR em tempo real TaqMan dos primers e sonda com alvo no rRNA 18S de *Plasmodium sp.* Análise dos resultados obtidos através das curvas de amplificação do DNA de *P. falciparum*, utilizando os pares de primers e sonda fluorogênica específica para o gene do rRNA 18S de *Plasmodium sp.* As concentrações do DNA do parasita estão indicadas pelas setas.

No experimento de sensibilidade dos primers e sondas com alvo no gene B1 de *T. gondii*, utilizando DNA de *T. gondii*, a menor concentração que o teste foi capaz de detectar foi 0,1 pg de DNA (Figura 20).

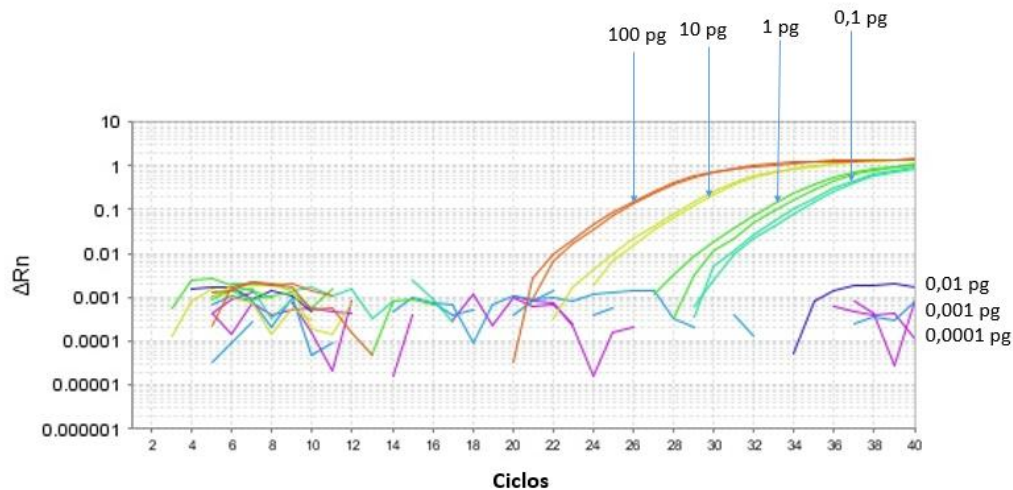


Figura 20: Teste de sensibilidade por PCR em tempo real TaqMan dos primers e sonda com alvo no gene B1 de *T. gondii*. Análise dos resultados obtidos através das curvas de amplificação de *T. gondii*, utilizando os pares de primers e sonda fluorogênica específica para o gene B1 de *T. gondii*. As concentrações do DNA do parasita estão indicadas pelas setas.

No ensaio multiplex, para testar a especificidade utilizando os primers e sondas com alvo no rRNA 18S de *Plasmodium sp.* e no gene B1 de *T. gondii*, com DNA de *P. falciparum* e de *T. gondii* na concentração de 1.000 pg, observamos que no teste individual com DNA de *T. gondii*, houve sinal duplamente positivo, ou seja, ambas as sondas emitiram sinais positivos de fluorescência, já com DNA de *P. falciparum* apenas a sonda específica (rRNA 18S) emitiu sinal positivo, nos testes com DNA de ambas as cepas houve sinal duplamente positivo, pois os materiais genéticos de ambos os parasitas estavam presentes (Figura 21).

Neste ensaio, os testes individuais com DNA de *P. falciparum* e *T. gondii*, revelaram que os valores de C_T ficaram bem próximos, ou seja, entre 22 e 26 ciclos. O teste utilizando o DNA de *P. falciparum* e *T. gondii* em conjunto não permitem diferenciação entre eles pelos valores de C_T , além do mais o DNA de *T. gondii* gera sinais duplamente positivos no teste multiplex, pois o gene do rRNA 18S e o gene B1 são amplificados.

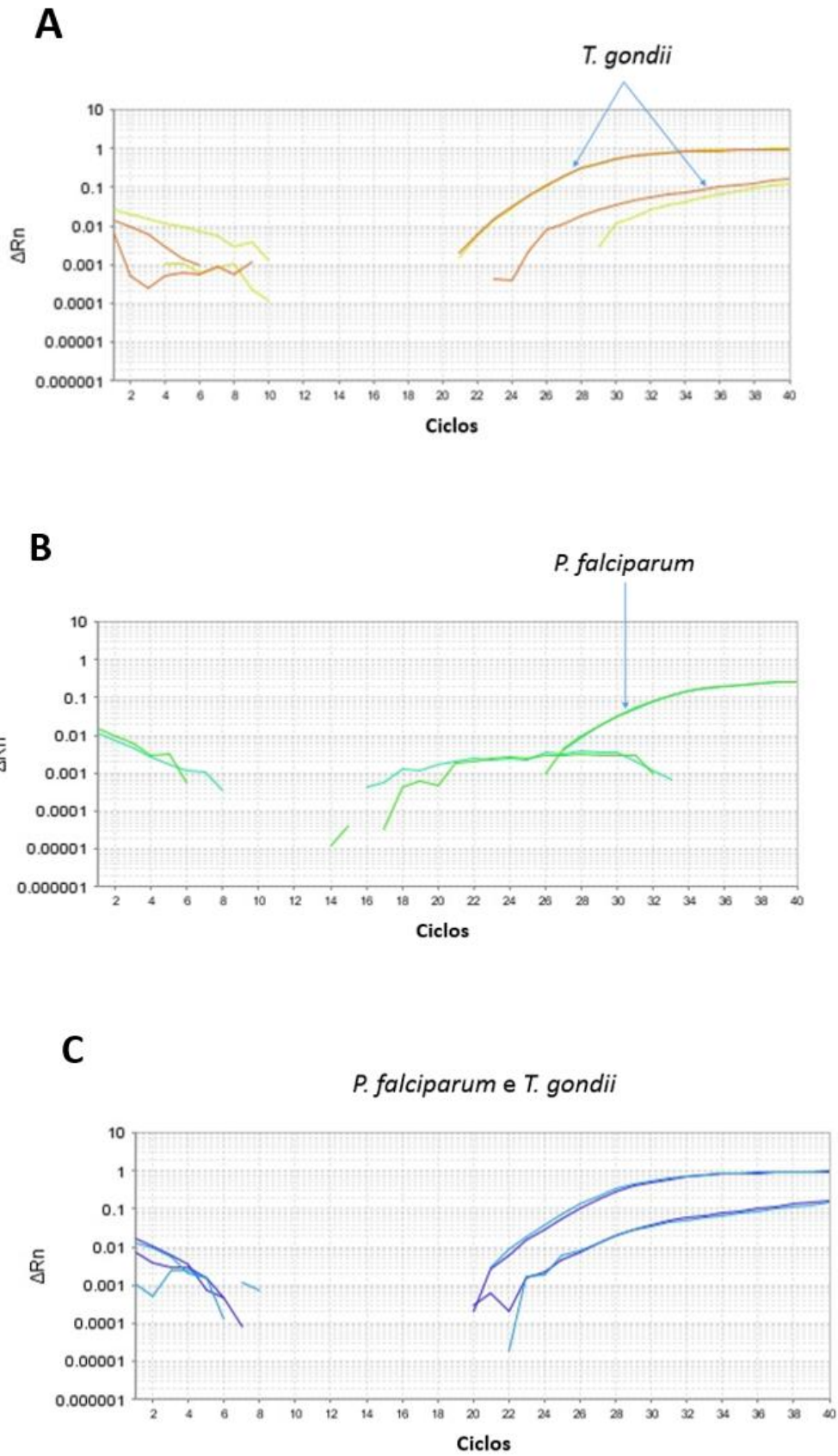


Figura 21: Avaliação de especificidade por teste multiplex utilizando a PCR em tempo real *TaqMan* com DNA de *P. falciparum* e *T. gondii*. Análise de especificidade dos primers e sondas com alvo no gene

do rRNA 18S de *Plasmodium sp.* e no gene B1 de *T. gondii*. **A.** Curvas de amplificação geradas pelos produtos do DNA individual de *T. gondii*, com os pares de primers e sondas específicos para o gene do rRNA 18S de *Plasmodium sp.* e o gene B1 de *T. gondii*. **B.** Curvas de amplificação geradas pelos produtos do DNA individual de *P. falciparum*, com os pares de primers e sondas específicos para o gene do rRNA 18S de *Plasmodium sp.* e o gene B1 de *T. gondii*. **C.** Curvas de amplificação geradas pelos produtos do DNA de *P. falciparum* e *T. gondii*, com os pares de primers e sondas específicos para o gene do rRNA 18S de *Plasmodium sp.* e o gene B1 de *T. gondii*.

As tabelas 4 a 7 apresentam um quadro resumo de todos os resultados obtidos nos testes de eficiência, sensibilidade (comparando ambas as técnicas *Sybr Green* e *TaqMan*) e especificidade obtida nos testes de amplificação cruzada e contra os organismos alvo.

Tabela 4: Resumo dos resultados dos testes de eficiência por qPCR *Sybr Green* utilizando diluições do DNA das cepas CL Brener de *T. cruzi*, *L. infantum*, *P. falciparum* e *T. gondii*.

Eficiência qPCR Sybr Green	
CL Brener	96,9%
<i>L. infantum</i>	101,1%
<i>P. falciparum</i>	100,6%
<i>T. gondii</i>	103,1%

Tabela 5: Resumo e comparação dos resultados de sensibilidade por qPCR *Sybr Green*.

Sensibilidade qPCR Sybr Green								
Alvo	CL Brener	Y	G	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>T. gondii</i>
rRNA 28 S de Trypanosomatidade	0,1 pg	0,1 pg	0,1 pg	NT*	NT*	NT*	NT*	NT*
Gene da seq. Satélite de <i>T. cruzi</i>	0,001 pg	0,001 pg	0,001 pg	NT*	NT*	NT*	NT*	NT*
Gene da AAP3 de <i>Leishmania sp.</i>	NT*	NT*	NT*	1 pg	10 pg	10 pg	NT*	NT*
Gene do rRNA 18S de <i>Plasmodium sp.</i>	NT*	NT*	NT*	NT*	NT*	NT*	1 pg	NT*
Gene B1 de <i>T. gondii</i>	NT*	NT*	NT*	NT*	NT*	NT*	NT*	10 pg

NT*: não testado.

Tabela 6: Resumo e comparação dos resultados de sensibilidade por qPCR *TaqMan*.

Sensibilidade pPCR TaqMan				
Alvo	CL Brener	<i>L. infantum</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>T. gondii</i>
Gene da seq. Satélite de <i>T. cruzi</i>	0,001 pg	NT*	NT*	NT*
Gene da AAP3 de <i>Leishmania sp.</i>	NT*	1 pg	NT*	NT*
Gene do rRNA 18S de <i>Plasmodium sp.</i>	NT*	NT*	1 pg	NT*
Gene B1 de <i>T. gondii</i>	NT*	NT*	NT*	0,1 pg

NT*: não testado.

Tabela 7. Resumo dos resultados de especificidade por qPCR *Sybr Green* e *TaqMan*.

Especificidade qPCR <i>Sybr Green</i> e qPCR <i>TaqMan</i>				
Alvo	<i>T. cruzi</i>	<i>Leishmania sp.</i>	<i>Plasmodium sp.</i>	<i>T. gondii</i>
rRNA 28 S de Trypanosomatidae	√	√	NT*	NT*
Gene da seq. Satélite de <i>T. cruzi</i>	√	●	NT*	NT*
Gene da AAP3 de <i>Leishmania sp.</i>	●	√	NT*	NT*
Gene do rRNA 18S de <i>Plasmodium sp.</i>	●	●	√	√
Gene B1 de <i>T. gondii</i>	●	●	●	√

√: presença de amplificação; ●: ausência de amplificação; NT*: não testado.

5 DISCUSSÃO

Um dos maiores desafios para a hemoterapia moderna é o desenvolvimento de técnicas que permitam aumentar a segurança transfusional, sobretudo relacionado à transmissão de infecções propagadas pelo sangue. Devido a isso a preocupação e discussão acerca da segurança transfusional vêm ganhando força tanto no uso racional de hemocomponentes quanto na evolução de técnicas de triagem que são cada vez mais sensíveis e específicas, como é o caso do teste NAT (FANG et al., 2003, SHANDER et al.; 2005).

Uma grande iniciativa mundial supriu a necessidade de desenvolver testes para rastrear o sangue destinado à doação, pesquisando a presença de infecções virais como o HIV e das hepatites tipo B e C, inclusive no Brasil (BRASIL, 2007). Esta iniciativa resultou na diminuição dos casos de transmissão destas doenças por transfusão sanguínea (NÜBLING et al., 2009).

Contudo, existe uma grande demanda por novos testes NAT que contemplem outros agentes infecciosos como é o caso dos protozoários parasitas *T. cruzi*, *Leishmania sp.*, *Toxoplasma gondi* e *Plasmodium sp.*

Com este intuito, neste estudo foram desenhados e testados primers e sondas específicos para realização da qPCR *Sybr Green* e *TaqMan* como ferramentas fundamentais para validação de um teste diagnóstico tipo NAT. Demonstramos que esta técnica é sensível, altamente específica e adequada na aplicação de testes de triagem e confirmatório em amostras destinadas à doação de sangue.

Para testes de triagem por qPCR *Sybr Green*, foram utilizados primers capazes de amplificar a região do rRNA 28S de *T. cruzi* e *Leishmania sp.*, que demonstraram eficiência e um limite de detecção semelhantes a outras metodologias aceitas no diagnóstico de ambos protozoários (DUFFY et al. 2013, MELO et al. 2015, TELLEVIK et al. 2014). Apesar dos testes serem realizados objetivando demonstrar a ausência ou a presença destes parasitas nas amostras testadas, a eficiência dos primers demonstrou que a reação de PCR proposta poderá ser futuramente utilizada em testes quantitativos que possibilitarão determinar a parasitemia da amostra.

Para o teste confirmatório proposto, selecionamos uma sequência conservada localizada no DNA satélite nos genomas de *T. cruzi* como alvo, estas sequências obtiveram um limite de detecção de 0,001 pg de DNA para *T. cruzi*, valor este

concordante com os descritos por Duffy et al. (2013) que é capaz de detectar cerca de 0,05 parasitas/mL.

De acordo com o modelo proposto por Tellevik et al. (2014), desenhamos os primers com alvo no gene da AAP3 de *Leishmania sp.* Neste trabalho os autores descreveram que com este par de primers e sonda, inclusive em outros estudos, foi possível detectar no mínimo 0,1 pg de DNA. Notamos que a sensibilidade foi variável entre as três espécies testadas, sendo que *L. infantum* foi a cepa com a qual obtivemos a menor concentração detectável de 1 pg de DNA. Isto se deve provavelmente ao fato de que exista heterogeneidade entre as diferentes espécies com relação ao número de cópias do gene alvo (AAP3) no genoma (BERZUNZA-CRUZ et al., 2009; NICOLAS et al., 2002; PRINA et al., 2007; GOMES et al., 2012; TALMI-FRANK et al., 2010; WORTMANN et al., 2001).

Os primers e sonda com alvo no gene do rRNA 18S, específicos para *Plasmodium sp.*, quando testados contra DNA de *T. gondii* geram sinais positivos de amplificação. Isto acontece porque a sonda hibridiza com sequências conservadas dentro do genoma de vários outros eucariotos homólogos, mas não com DNA humano (Rougemont et al., 2004). Isto do ponto de vista transfusional é benéfico, pois qualquer tipo de contaminação da bolsa de sangue poderia assim ser detectada.

A geração de sinais duplamente positivos nos testes multiplex poderia representar um obstáculo à diferenciação entre o DNA dos dois parasitas. No entanto, isto pode ser solucionado apenas por meio da qPCR *TaqMan*, utilizando as sondas separadamente, uma vez que cada uma delas é marcada com fluoróforos diferentes. A sonda específica para amplificação do gene do rRNA 18S é marcado com fosforamidita (HEX), e a sonda específica para a amplificação do gene B1 é marcada com 6-carboxifluoresceína (FAM). Se houver sinal positivo de fluorescência apenas para HEX, o DNA de *Plasmodium sp.* estará presente na amostra, se ocorrer sinal positivo para FAM e para HEX, o DNA de *T. gondii* ou de ambos os parasitas estará presente. Nos casos em que houver contaminação pelos dois parasitas na mesma amostra, esta será considerada positiva e determinará critério de exclusão da bolsa de sangue destinada à transfusão.

O gene B1 é uma sequência repetitiva e altamente conservada entre as cepas de *T. gondii* (JONES et al. 2000). O limite de detecção no teste de sensibilidade do gene B1 de *T. gondii* foi de 0,5 parasitas/ μ L (10 pg de DNA) com qPCR *Sybr Green* e no teste com sonda *TaqMan* este limite foi de 0,005 parasitas/ μ L (0,1 pg de DNA),

semelhante ao que foi descrito no trabalho de Lin et al. (2000), no qual o limite de detecção foi de 0,05 parasitas/reação. Neste caso, a qPCR *TaqMan* mostrou-se significativamente mais sensível para detecção do DNA de *T. gondii*.

Em todos os testes nos quais o DNA humano foi adicionado às reações na concentração fixa de 1.000 pg, observamos que não houve alteração da eficiência de amplificação, pois a inclinação da curva padrão gerada a partir das diluições seriadas permaneceu inalterada.

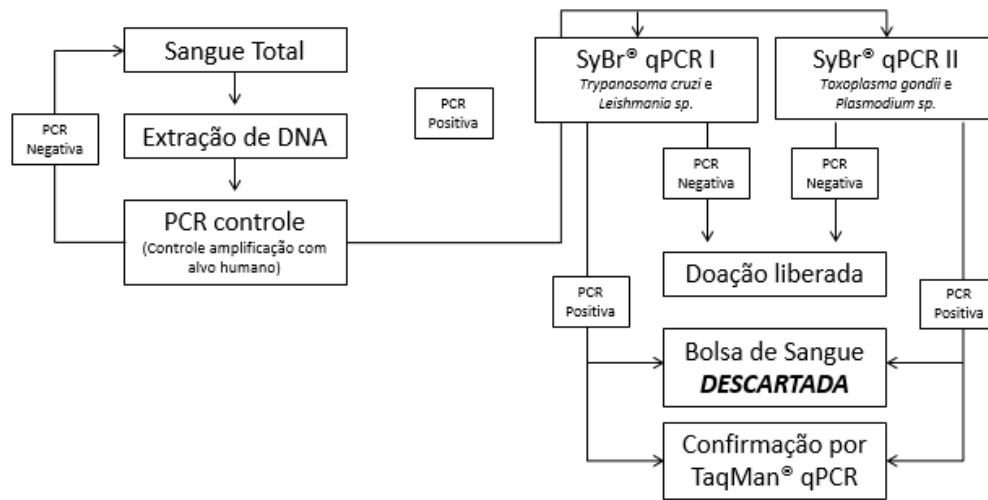
Levando em consideração os resultados obtidos para cada alvo, um fluxo de trabalho foi proposto para a rotina aplicável a um laboratório NAT de hemocentros. A rotina deve ser dividida em uma etapa de triagem e uma etapa de confirmação de testes positivos.

Na primeira etapa de triagem, deve ser extraído o DNA do sangue total das amostras destinadas à doação, para serem posteriormente submetidas a testes de triagem por qPCR *Sybr Green* (I), para a detecção do DNA de tripanossomatídeos utilizando os primers com alvo no rRNA 28S, e qPCR *Sybr Green* (II), para detecção do DNA de *Plasmodium sp.* e/ou *T. gondii*, utilizando os primers com alvo no rRNA 18S. A positividade em um dos testes ou em ambos determinaria descarte da bolsa de sangue e seria confirmada por qPCR *TaqMan* a fim de determinar a presença do DNA de um protozoário parasita específico.

Nesta segunda etapa, seria aplicado o teste confirmatório, onde todas as amostras positivas na qPCR *Sybr Green* (I) seriam submetidas a testes multiplex por qPCR *TaqMan* (I), utilizando os primers e sondas específicos para amplificação de genes de *T. cruzi* e *Leishmania sp.*, as amostras que expressarem um sinal positivo com FAM, estariam contaminadas por *T. cruzi*, as amostras que resultarem em sinal HEX positivo, estariam contaminadas por *Leishmania sp.*, e aquelas cujo resultado for duplamente negativo, seriam consideradas indeterminadas, a bolsa seria descartada e solicitada uma nova coleta de amostras.

As amostras positivas na qPCR *Sybr Green* (II), seriam confirmadas por qPCR *TaqMan* (IIA), utilizando a sonda marcada com HEX, se o resultado for negativo, a amostra seria considerada indeterminada, o que demandaria o descarte da bolsa e a requisição de nova amostra, se o resultado for positivo, para determinação específica do patógeno, seria realizada a qPCR *TaqMan* (IIB), utilizando a sonda marcada com FAM, o resultado positivo determinaria infecção por *T. gondii* e o resultado negativo determinaria infecção por *Plasmodium sp* (Figura 22).

Primeira etapa – Triagem das Amostras



Segunda Etapa – Teste Confirmatório

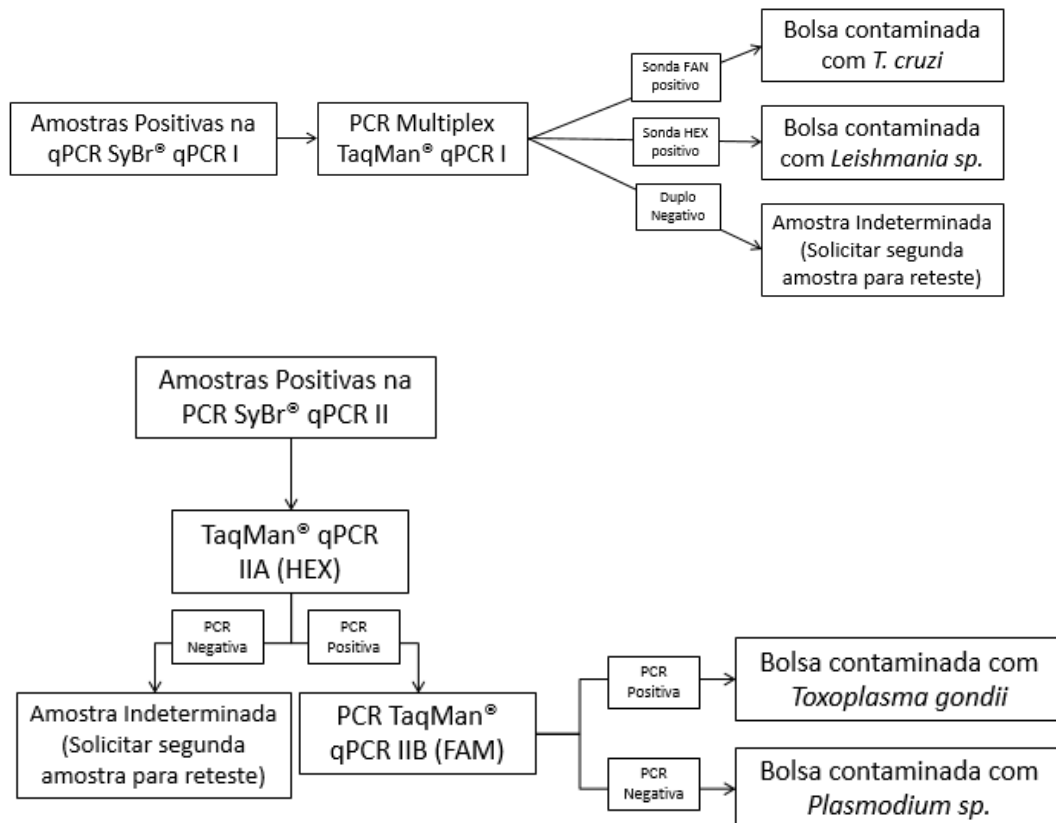


Figura 22: Esquema de aplicabilidade futura de testes de triagem e confirmatório por qPCR *Sybr Green* e *TaqMan* em bancos de sangue.

Em todos os ensaios de triagem (qPCR *Sybr Green*) e confirmatório (qPCR *TaqMan*) nas amostras clínicas, um controle de amplificação interno poderá ser utilizado, como por exemplo um par de primers com alvo no gene que codifica a beta globina, afim de amplificar apenas o DNA humano, uma vez que as cópias deste gene estarão sempre presentes em uma quantidade maior do que as cópias alvo do organismo infeccioso. Além do mais, quando estas amostras forem analisadas, o controle de amplificação poderá diferir em valores de C_T , o que possibilitaria a avaliação da extração do DNA, bem como quantificar os amplicons da sequência alvo com relação ao volume de amostra.

Shahzamani et al. (2011) desenvolveram um ensaio que identifica o genoma do HCV, utilizando a PCR com uma molécula fluorescente chamada *Sybr Green I*. A técnica demonstrou ser mais viável do ponto de vista econômico e mais simples de operar em comparação com métodos que utilizam sondas marcadas, que são mais caras e complexas com relação ao desenho dos oligonucleotídeos e aos parâmetros da reação de amplificação. Além do mais, alguns artefatos, como eventuais mutações nas sequências alvo dos genes selecionados, puderam ser detectados durante a análise da curva de melting. Os autores também relataram que uma das vantagens da técnica é o baixo custo, sendo que a RT-PCR qualitativa para detecção de HCV por amostra custa em torno de \$40 a \$80, enquanto o teste desenvolvido por PCR *Sybr Green* custa \$14,2 para obter o mesmo resultado.

No estudo realizado por Mohammadi et al. (2017) foram comparados três métodos baseados em PCR para detecção de infecção por *Leishmania tropica*, com relação a custo-efetividade. Foi demonstrado que a técnica de PCR-RFLP consumiu um tempo de 7,5 horas e teve um custo médio de \$5,72, a técnica de sequenciamento por PCR demorou um tempo de 3 a 7 dias e custou \$11,2 por teste e a metodologia de *melting* de alta resolução (HRM) levou um tempo de 2,5 horas e teve um custo de \$4,46 por teste.

Em análise quantitativa de expressão gênica, *Sybr Green* e *TaqMan* são os métodos mais utilizados, *Sybr Green* é mais barato e simples do que *TaqMan* por não necessitar do desenho e síntese de sondas fluorogênicas específicas. A vantagem da qPCR *TaqMan* reside no desenho de sondas duplamente marcadas, ao passo que *Sybr Green* se baseia na ligação de um corante fluorescente ao DNA de fita dupla, por isso, nesta metodologia, qualquer produto inespecífico como dímeros de primers pode gerar resultados falso positivos. No entanto, a otimização desta técnica, por exemplo,

através de softwares e protocolos apropriados pode melhorar o desempenho e a qualidade do teste, equiparando-se ao método *TaqMan* (TAJADINI et al. 2014).

Desta forma, o teste NAT para detecção de parasitas protozoários aplicando uma primeira etapa de triagem por qPCR *Sybr Green*, além de prático, seria uma alternativa do ponto de vista econômico, muito mais viável, uma vez que esta metodologia é menos onerosa do que a qPCR *TaqMan*, que seria utilizada apenas para confirmação das amostras que resultarem positivas no primeiro teste. Pelos resultados obtidos, a qPCR *Sybr Green* é perfeitamente aplicável à triagem em bancos de sangue por ter uma sensibilidade muito similar a qPCR *TaqMan*. Para fins transfusionais o mais relevante é que o teste seja mais sensível do que específico, pois o importante não é determinar o tipo de parasita e sim se o risco de a amostra estar contaminada por qualquer um dos patógenos existe ou não. Nos casos em que também há necessidade de diferenciação entre os patógenos para fins diagnósticos, uma alternativa favorável que as sondas *TaqMan* proporcionam ao aumento da especificidade é serem acopladas a fluoróforos diferentes para cada gene alvo.

6 CONCLUSÃO

Concluimos que nos testes de triagem de amostras para doação de sangue, utilizando a PCR em tempo real *Sybr Green*, o par de primers com alvo no rRNA 28S de *Trypanosomatidae* é capaz de detectar de forma sensível e específica o DNA de tripanossomatídeos (*T. cruzi* e *Leishmania sp.*) e o par de primers com alvo no rRNA 18S promove amplificação sensível e específica do DNA de *Plasmodium sp.* e/ou *T. gondii*.

Os testes com sondas fluorogênicas (qPCR *TaqMan*) revelaram alta especificidade e sensibilidade semelhante aos testes com qPCR *Sybr Green* para a detecção do DNA dos parasitas *T. cruzi*, *Leishmania sp.* e *Plasmodium sp.*, e uma sensibilidade maior para detecção do DNA de *T. gondii*.

Portanto o teste NAT para detecção do DNA de *T. cruzi*, *Leishmania sp.*, *Plasmodium sp.* e *T. gondii*, é adequado para ser aplicado em rotina laboratorial de hemocentros, na seleção de bolsas destinadas à doação de sangue.

Sugerimos que no teste inicial de triagem por qPCR *Sybr Green* todos os resultados positivos de amplificação sejam submetidos ao teste confirmatório por qPCR *TaqMan*. A positividade apenas no teste de triagem ou em ambos os testes (triagem e confirmatório) determinarão o critério de exclusão da bolsa de sangue. Se o teste resultar em resultado negativo na triagem não será necessária a realização do teste confirmatório e a bolsa será considerada livre de contaminação por estes protozoários parasitas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAS, A., GÁLLEGO M., LLOVET T., TEBAR S. et al. Serological diagnosis of chronic Chagas disease: is it time for a change?. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1566-1572, 2016.

AHRBERG, C. D.; NEUŽIL, P. Doubling throughput of a real-time PCR. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

AKHOUNDI, M., KHULS K., CANNET A., VOTÝPKA J., et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.

AKHOUNDI, M.; DOWNING T.; VOTÝPKA J.; KUHL S. et al. *Leishmania* infections: molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, 2017.

ALHO R. M., MACHADO K. V. A., VAL F. F. A., FRAJJI N. A.. Alternative transmission routes in the malaria elimination era: an overview of transfusion-transmitted malaria in the Americas. **Malaria Journal**, v.16, p.78, 2017.

ALMEIDA M. E., KORU O., STEURER F., HERWALDT B. L., SILVA A. J. Detection and Differentiation of *Leishmania spp.* in Clinical Specimens by use of a *Sybr Green*-Based Real-Time PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, 2017.

AL-SALEM, W.; HERRICKS, J. R.; HOTEZ, P. J. A review of visceral leishmaniasis during the conflict in South Sudan and the consequences for East African countries. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 460, 2016.

ANGHEBEN A, BOIX L, BUONFRATE D, GOBBI F, BISOFFI Z, PUPELLA S, GANDINI G, APRILI G. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. **Blood Transfusion**, v.13, p. 540-550, 2015.

ASSIH, M.; FETEKE L.; BISSEYE C.; OUERMI D. et al. Molecular diagnosis of the human immunodeficiency, hepatitis B and C viruses among blood donors in Lomé (Togo) by multiplex real time PCR. **The Pan African Medical Journal**, v. 25, 2016.

BAIRD, J. K.; VALECHA N.; DUPARC S.; WHITE N.J.; PRICE R.N. Diagnosis and treatment of *Plasmodium vivax* malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 6_Suppl, p. 35-51, 2016.

BALOUZ, V.; AGÜERO, F.; BUSCAGLIA, C. A. Chapter one-Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. **Advances in Parasitology**, v. 97, p. 1-45, 2017.

BERZUNZA-CRUZ, M., BRICAIRE, G., SUAZO S. N., PEREZ-MONTFORT, R., BECKER, I., PCR for identification of species causing American cutaneous leishmaniasis. **Parasitology Research**, v.104, p. 691–699, 2009.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014—**Ministério da Saúde**. 2015; (46) n. 25. ISSN 2358- 9450, 2015.

BONI S. M., OYAFUSO L. K., SOLER R. C., LINDOSO J. A. L. Efficiency of noninvasive sampling methods (swab) together with Polymerase Chain Reaction (PCR) for diagnosing American Tegumentary Leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**;v.59,e.38, 2017.

BOUSEMA, T.; OKELL L.; FELGER I. DRAKELEY, C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 12, n. 12, p. 833, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Rede Brasileira de Avaliação de Tecnologias em Saúde. O teste de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) e as demais estratégias para detecção dos vírus HIV-1 e HCV na triagem de sangue doado. **Boletim Brasileiro de Avaliação de tecnologias em Saúde** nº 3. Brasília, 2007.

BRILHANTE A. F., MELCHIOR L. A. K., NUNES V.L. B., CARDOSO C. O., GALATI E. A. B. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in an endemic area of forest extractivist culture in western Brazilian Amazonia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.59,e.12, 2017.

BRITTON, S.; CHENG, Q.; MCCARTHY, J. S. Novel molecular diagnostic tools for malaria elimination: a review of options from the point of view of high-throughput and applicability in resource limited settings. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 88, 2016.

CANCINO-FAURE B, FISA R, RIERA C, BULA I, GIRONA-LLOBERA E, JIMENEZ-MARCO T Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors. **Transfusion**, v.55, p. 1249-1255, 2015.

CAPUANI L., BIERRENBACH A. L., ALENCAR A. P., MENDRONE, JR A. Mortality among blood donors seropositive and seronegative for Chagas disease(1996± 2000) in SãoPaulo, Brazil: A death certificate linkage study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, 2017.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 2016.

CHIGURUPATI, P.; MURTHY, K. S. Automated nucleic acid amplification testing in blood banks: an additional layer of blood safety. **Asian Journal of Transfusion Science**, v. 9, n. 1, p. 9, 2015.

COMMODARO A. G., CHIASSON M., SUNDAR N., RIZZO L. V., BELFORT JR R., Grigg. M. E. Elevated *Toxoplasma gondii* infection rates for retinas from eye banks, Southern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.21, n.4, 2015.

CONTI R. V., LANE V. F. M., MONTEBELLO L., PINTO JUNIOR V. L. Visceral leishmaniasis epidemiologic evolution in timeframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 53, pp. 99–104, 2016.

DIAS J. C. P., RAMOS JR A. N., GONTIJO E. D., LUQUETTI A. et al. 2nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, supl. I, 2016

DUFFY, T.; CURA C.I.; RAMIREZ.; J.C.; ABATE T. et al. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, p. e2000, 2013.

FANG C.T., FIELD S.P., Busch M.P., Heyns, A.P. Human immunodeficiency virus-1 and hepatitis C virus RNA among South African blood donors: estimation of residual transfusion risk and yield of nucleic acid testing. **VoxSanguinis**, v.85(1):9-19, 2003.

FREITAS E. C., OLIVEIRA M. F., VASCONCELOS A. S. O. B., SILVA FILHO J. D. Analysis of the seroprevalence of and factors associated with Chagas disease in an endemic area in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.50, n.1, p:44-51, 2017.

FUKUTANI K. F. , FIGUEIREDO V. , CELES F. S. , CRISTAL J. R et al. Serological survey of Leishmania infection in blood donors in Salvador, Northeastern Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v.14, p.422, 2014.

GOMES, L.I., GONZAGA, F.M., DE MORAIS-TEIXEIRA, E., DE SOUZA-LIMA, B.S., FREIRE, V.V., RABELLO, A. Validation of quantitative real-time PCR for the in vitro assessment of antileishmanial drug activity. **Experimental Parasitology**, v. 131, p. 175–179, 2012.

GRANJON, E.; DICHTTEL-DANJOY M.L.; SABA E.; SABINO E. et al. Development of a novel multiplex immunoassay multi-cruzi for the serological confirmation of Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004596, 2016.

GUZMÁN-GÓMEZ, D.; LÓPEZ-MONTEON A.; LAGUNES-CATRO M.S., ÁLVAREZ-MARTÍNEZ C. et al. Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, Mexico: role of the antigen used for diagnostic. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 466, 2015.

HAINES, A. M.; TOBE, S. S.; LINACRE, A. Optimization of diamond nucleic acid dye for quantitative PCR. **BioTechniques**, v. 61, n. 4, p. 183-189, 2016.

HORRILLO, L.; SAN MARTÍN J.V.; MOLINA L.; MADROÑAL E. et al. Atypical presentation in adults in the largest community outbreak of leishmaniasis in Europe (Fuenlabrada, Spain). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 3, p. 269-273, 2015.

HOWES, R. E.; BATTLE K.E.; MENDIS K.N.; SMITH D.L. et al. Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 6_Suppl, p. 15-34, 2016.

IZETA-ALBERDI, A.; IBARRA-CERDEÑA C.N.; MOO-LLANES D.A.; RAMSEY J.M. Geographical, landscape and host associations of *Trypanosoma cruzi* DTUs and lineages. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 631, 2016.

JARA, M.; BERG M.; CALJON G.; MUYLDER G. et al. Macromolecular biosynthetic parameters and metabolic profile in different life stages of *Leishmania braziliensis*: amastigotes as a functionally less active stage. **PloS One**, v. 12, n. 7, p. e0180532, 2017.

- JONES, C.D; OKHRAVI N.; ADAMSON, P.; TASKER S.; LIGHTMAN. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.41, 634-644, 2000.
- KAKANI P., SUMAN S.; GUPTA, L.; KUMAR, S. Ambivalent outcomes of cell apoptosis: a barrier or blessing in malaria progression. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.
- KARIMI G., MARDANI A., ZADSAR M. Prevalence of *Toxoplasma gondii* among Iranian Blood Donors: A Narrative Review Article. **Iran Journal of Parasitology**, v. 11, n. 1, pp.10-18, 2016.
- KRAMPA F. D. ,ANIWEH Y. ,AWANDARE G. A. ,KANYONG P . Recent Progress in the Development of Diagnostic Tests for Malaria. **Diagnostics (Basel)**, v.7. n.3, p 54, 2017.
- LIMA, G. F. M.C.; LUCCHI N.W.; SILVA-FLANNERY L.; MACEDO-DE-OLIVEIRA A. et al. Still searching for a suitable molecular test to detect hidden *Plasmodium* infection: a proposal for blood donor screening in Brazil. **PloS One**, v. 11, n. 3, p. e0150391, 2016.
- LIN, M.; CHEN T., KUO, T.; TSENG, C. et al. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4121-4125, 2000.
- LINDBLADE, K. A.; STEINHARDT L.; SAMUELS A. KACHUR S.P.; SLUTSKER L. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 6, p. 623-639, 2013.
- LINDOSO, J. A. L.; CUNHA M.A.; QUEIROZ I.T., MOREIRA, C.H.V. Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. **HIV/AIDS (Auckland, NZ)**, v. 8, p. 147, 2016.
- LIU, Q.; WANG Z.; HUANG S.; ZHU X. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 292, 2015.
- LIU, Z.; GUTIERREZ-VARGAS C.; WEI J.; GRASSUCCI R.A. et al. Structure and assembly model for the *Trypanosoma cruzi* 60S ribosomal subunit. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201614594, 2016.
- LORENZ C., VIRGINIO F., AGUIAR B. S., SUESDEK L. CHIARAVALLOTTI- NETO F. Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. **Malaria Journal**. v.14, p.408, 2015.
- LÜDER, C. G. K.; RAHMAN, T. Impact of the host on *Toxoplasma* stage differentiation. **Microbial Cell**, v. 4, n. 7, p. 203, 2017.
- MANSOURI, A.; MOJARAD M.R.A.; BADFAR G.; ABASIAN L. et al. Epidemiology of *Toxoplasma gondii* among blood donors in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Transfusion and Apheresis Science**, 2017.
- MELO, M. F.; MOREIRA O.C.; TENÓRIO P.; LORENA V. et al. Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 154, 2015.

MOHAMMADI M. A., BAMOROVAT M., FASIHI HARANDI M., KARIMI T., SHARIFI I., AFLATOONIAN M. R. Comparison of Three PCR-based Methods for Simplicity and Cost Effectiveness Identification of Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. **Iran Journal of Parasitology**, v. 12, n. 2, pp. 215-223, 2017.

MOUSAVI M., SARAVANI R., MODREK M. J., SHAHRAKIPOUR M.; SEKANDARPOUR S. Detection of *Toxoplasma gondii* in Diabetic Patients Using the Nested PCR Assay via RE and B1 Genes. **Jundishapur Journal of Microbiology**; v.9, n.2, e.29493, 2016.

MUKRY, S. N.; SAUD M.; SUFAIDA G.; SHAIKH K.; NAZ A.; SHAMSI T.S. Laboratory diagnosis of Malaria: comparison of manual and automated diagnostic tests. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2017, 2017.

NAVARRO, E.; SERRANO-HERAS G.; CASTAÑO M.J.; SOLERA J. Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 231-250, 2015.

NICOLAS, L., PRINA, E., LANG, T., MILON, G. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1666–1669, 2002.

NÜBLING C.M., HEIDEN M., CHUDY M., KRESS J., SEITZ R., KELLER-STANISLAWSKI B. et al. Experience of mandatory nucleic acid test (NAT) screening across all blood organizations in Germany: NAT yield versus breakthrough transmissions. **Transfusion**, v. 49(9):1850-1858, 2009.

OLLIARO, P. L.; BARNWELL J.W.; BARRY A.; MENDIS K. et al. Implications of *Plasmodium vivax* biology for control, elimination, and research. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 6_Suppl, p. 4-14, 2016.

OLORUNMOTENI, O. E.; ADEODU O.O.; OSENI S.B.A.; OBUOTOR E.M. Cerebrospinal fluid and plasma β -endorphin levels in children with cerebral malaria. **Brain and Behavior**, v. 7, n. 4, 2017.

PAIVA-CAVALCANTI, M.; MORAIS R.C.S.; PESSOA-E-SILVA R.; TRAJANO-SILVA L.A.M. et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 31, 2015.

PECH-CANUL, Á. C.; MONTEÓN, V.; SOLÍS-OVIEDO, R. A Brief view of the surface membrane proteins from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Parasitology Research**, v. 2017, 2017.

PRINA, E., ROUX, E., MATTEI, D., MILON, G. Leishmania DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1307–1315, 2007.

RAMÍREZ J.C., PARRADO R., SULLEIRO E., DE LA BARRA A. First external quality assurance program for Bloodstream Real-Time PCR monitoring of Treatment response in clinical trials of Chagas Disease. **Plos One**, v.12, n.11, e0188550, 2017.

REIS L. L., BALIEIRO A. A. S., FONSECA F. R.; GONÇALVES M. J. F. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.50, n.5, p.638-645, 2017.

REIS-CUNHA, J. L.; RODRIGUES-LUIZ G.F.; VALDIVIA H.O.; BAPTISTA R.P. et al. Chromosomal copy number variation reveals differential levels of genomic plasticity in distinct *Trypanosoma cruzi* strains. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 499, 2015.

ROCHA-GASO M., VILLARREAL-GÓMEZ L., BEYSSEN D., SARRY F. et al. Biosensors to Diagnose Chagas Disease: A Brief Review. **Sensors**, v.17, n.11, p.2629, 2017.

ROUGEMONT, M.; VAN SAANEM, M.; SAHLI, R.; HINRIKSON H. et al. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5636-5643, 2004.

SAAVEDRA, M.; ZULANTAY I.; APT W.; CASTILLO J. et al. Quantification by real-time PCR of *Trypanosoma cruzi* DNA in samples of *Triatoma infestans* used in xenodiagnosis of chronic Chagas disease patients. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 382, 2016.

SAGI, O.; BERKOWITZ A.; CODISH S.; NOVACK V. et al. Sensitive molecular diagnostics for cutaneous Leishmaniasis. In: **Open Forum Infectious Diseases**. Oxford University Press, 2017.

SHAHZAMANI K. , SABAH F., MERAT S. , SADEGHIZADEH M. et al. Rapid Low-cost detection of Hepatitis C Virus RNA in HCV infected patients by Real-time RT-PCR using *Sybr Green I*. **Archives of Iranian Medicine**, v. 14, n. 6, 2011

SHANDER A., GROSS I., HILL S., JAVIDROOZI M., SLEDGE S. A new perspective on best transfusion practices. **Blood Transfusion**, v.11(2):193-202, 2013.

SILVA M. G., VINAUD M. C., CASTRO A. M. Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women and vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in patients from basic units of health from Gurupi, Tocantins, Brazil, from 2012 to 2014. **Plos One**, v. 10, n.11, e. 0141700 2015

SIQUEIRA A. M., MESONES-LAPOUBLE O., MARCHESINI P., SAMPAIO V. S. *Plasmodium vivax* landscape in Brazil: scenario and challenges. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**., v.95(Suppl 6), pp. 87–96, 2016.

SLAVOV S. N., OTAGUIRI K. K., PINTO M. T., VALENTE V. B. et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* antibodies in blood donors from the São Paulo State, Brazil, between 2012 and 2014. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.11 n.3, p. 277-281, 2017.

SNOUNOU G. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. **Species Diagnostics Protocols. Methods in Molecular Biology**;v.50, pp. 263–91, 1996.

SOUTO, R. P.; FERNANDES O.; MACEDO A.M.; CAMPBELL D.A.; ZINGALES B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 141-152, 1996.

STAUCH, A.; DUERR H.; PICADO A.; OSTYN B. et al. Model-based investigations of different vector-related intervention strategies to eliminate visceral leishmaniasis on the Indian subcontinent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2810, 2014.

SULTAN, S.; NASIR M.I.; RAFIQ S.; BAIG M.A.; et al. Multiplex real-time RT-PCR assay for transfusion transmitted viruses in sero-negative allogeneic blood donors: an experience from Southern Pakistan. **The Malaysian Journal of Pathology**, v. 39, n. 2, p. 149, 2017.

TAJADINI M., PANJEHPOUR M., HAGHJOOY JAVANMARD S. Comparison of *Sybr Green* and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. **Advanced Biomedical Research**. 3:85, 2014.

TALMI-FRANK, D., NASEREDDIN, A., SCHNUR, L.F., SCHONIAN, G., TOZ, S.O., JAFFE, C.L., BANETH, G. Detection and identification of old world *Leishmania* by high resolution melt analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, e. 581, 2010.

TELLEVIK, M. G.; MULLER K.E.; LOKKEN K.R.; NERLAND A.H. Detection of a broad range of *Leishmania* species and determination of parasite load of infected mouse by real-time PCR targeting the arginine permease gene AAP3. **Acta Tropica**, v. 137, p. 99-104, 2014.

VANWORMER, E.; FRITZ H.; SHAPIRO K.; MAZET J.A.K.; CONRAD P.A. Molecules to modeling: *Toxoplasma gondii* oocysts at the human–animal–environment interface. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 3, p. 217-231, 2013.

WEYERS, W. William Boog Leishman—A brief reminder of his life and work on the occasion of his 150th birthday. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 38, n. 6, p. 436-443, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> **Geneva: World Health Organization**; 2015 [acesso em fev. 2018].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report in neglected tropical diseases. Geneva: **World Health Organization**; 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Neglected tropical diseases [Internet].; Disponível em: www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/ **Geneve: WHO**, 2017. [acesso em fev. 2018].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> **WHO**. [acesso em fev. 2018].

WORTMANN, G., SWEENEY, C., HOUNG, H.S., ARONSON, N., STITELER, J., JACKSON, J., OCKENHOUSE, C. Rapid diagnosis of leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 583–587, 2001.

XIAO, J.; YOLKEN, R. H. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. **Acta Physiologica**, v. 213, n. 4, p. 828-845, 2015.

YANG, J.; KEMPS-MOLS B.; SPRUYT-GERRITSE M., ANHOLTS J. et al. The source of *Sybr Green* master mix determines outcome of nucleic acid amplification reactions. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 1, p. 292, 2016.

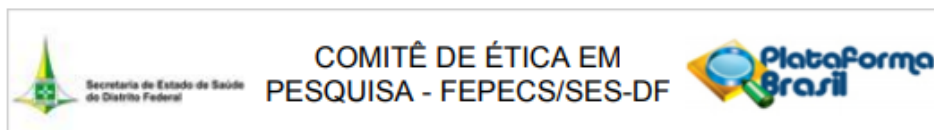
ZAINODINI, N.; ZARE-BIDAKI M.; ABDOLLAHI S.H.; AFROOZ M. et al. Molecular and serological detection of acute and latent toxoplasmosis using real-time PCR and ELISA techniques in blood donors of Rafsanjan City, Iran, 2013. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 9, n. 3, p. 336, 2014.

ZHANG, Q.; WANG J.; DENG F.; YAN Z. et al. TqPCR: a touchdown qPCR assay with significantly improved detection sensitivity and amplification efficiency of *Sybr Green* qPCR. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132666, 2015.

ZHANG, X.; LAI M.; CHANG W.; YU I. et al. Structures and stabilization of kinetoplastid-specific split rRNAs revealed by comparing leishmanial and human ribosomes. **Nature Communications**, v. 7, p. 13223, 2016.

ANEXO A

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento e validação de kit diagnóstico NAT para detecção de parasitas protozoários (*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* sp., *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium* sp.) em rotina de triagem de doadores de sangue no Distrito Federal

Pesquisador: Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 37778114.7.0000.5553

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE BRASÍLIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 942.653

Data da Relatoria: 01/02/2015

Apresentação do Projeto:

Nas últimas décadas o teste NAT (Nucleic Acid Test) tornou-se parte fundamental na triagem dos Bancos de Sangue em países desenvolvidos e em desenvolvimento. O NAT é comumente utilizado para a detecção do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e do vírus da Hepatite C Humana (HCV). Nenhum teste NAT foi desenvolvido para a pesquisa de patógenos protozoários.

O Brasil é um país endêmico para leishmanioses, toxoplasmose, malária e doença de Chagas. Além disso, sabe-se que com a maior mobilidade das populações e a emigração de pessoas de áreas endêmicas para áreas não endêmicas, a transmissão de doenças parasitárias via transfusão sanguínea e transplante de órgãos aumentou nos últimos anos.

Portanto, torna-se importante o desenvolvimento de uma ferramenta molecular para a detecção de parasitas protozoários presentes em bolsas de sangue destinadas à transfusão sanguínea, aumentando assim, a segurança no uso de hemoderivados e no transplante de órgãos.

Objetivo da Pesquisa:

Geral:

- Desenvolver e validar um kit diagnóstico NAT (nucleic acid test) por PCR em tempo real para

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com



Secretaria de Estado de Saúde
do Distrito Federal

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - FEPECS/SES-DF



Continuação do Parecer: 942.653

detecção de DNA de protozoários patogênicos em bolsas de sangue destinadas à transfusão sanguínea.

Específicos:

- Montagem dos protocolos para o desenvolvimento do kit diagnóstico, aquisição do material necessário para os testes NAT.
- Otimização da metodologia do sistema NAT em PCR em tempo real para a detecção de todos parasitas propostos nesse projeto: Plasmodium, Trypanosoma cruzi, Leishmania e Toxoplasma gondii.
- Realizar testes com amostras de bolsas de sangue e execução de testes sorológicos complementares.
- Conclusão dos testes preliminares e validação do kit diagnóstico em amostragem representativa.
- Formação de servidores da FHB para execução do teste diagnóstico desenvolvido.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os sujeitos foram adequadamente identificados. O aumento da segurança transfusional após aplicação do teste a ser desenvolvido apresenta-se como benefício da pesquisa. Os antecedentes científicos que justificam a pesquisa foram apresentados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está prevista para o início de novembro/2014. Será desenvolvido e validado um kit diagnóstico NAT (nucleic acid test) por PCR em tempo real para detecção de DNA de protozoários patogênicos utilizando-se amostras de sangue coletadas e analisadas pela FHB.

Serão realizados testes com aproximadamente 1.500 amostras, utilizando a metodologia do sistema NAT em PCR em tempo real para a detecção de todos parasitas propostos nesse projeto: Plasmodium, Trypanosoma cruzi, Leishmania e Toxoplasma gondii, com amostras de bolsas de sangue. As análises serão realizadas no equipamento da Applied Biosystems, modelo Step One Plus, no Laboratório de Biologia do Gene/UnB.

A execução dos testes sorológicos complementares para leishmaniose, toxoplasmose e malária serão realizados também no Laboratório de Biologia do Gene/UnB, visto que esses não fazem parte da rotina da FHB.

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE

CEP: 70.710-904

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3325-4955

Fax: (33)3325-4955

E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Secretaria de Estado de Saúde
do Distrito Federal

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - FEPECS/SES-DF



Continuação do Parecer: 942.653

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto: Apresentada.

Termos de Concordância: Apresentados.

Curriculum Vitae do(s) pesquisador(es): Apresentados.

Cronograma da Pesquisa: Apresentado.

Planilha de orçamento: Apresentada.

Liberação do TCLE: Apresentado.

Recomendações:

O pesquisador assume o compromisso de garantir o sigilo que assegure o anonimato e a privacidade dos sujeitos da pesquisa e a confidencialidade dos dados coletados. Os dados obtidos na pesquisa deverão ser utilizados exclusivamente para a finalidade prevista no seu protocolo, que só poderá iniciar após aprovação pelo CEP/FEPECS/SES/DF.

O pesquisador deverá encaminhar relatório final ao término da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- Projeto Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE

CEP: 70.710-904

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3325-4955

Fax: (33)3325-4955

E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Secretaria de Estado de Saúde
do Distrito Federal

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA - FEPECS/SES-DF



Continuação do Parecer: 942.653

BRASILIA, 02 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
Helio Bergo
(Coordenador)

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE

CEP: 70.710-904

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3325-4955

Fax: (33)3325-4955

E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com