



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
Coordenadoria Geral de Pesquisa – CGP
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bloco 06 – Bairro Ininga
Cep: 64049-550 – Teresina-PI – Brasil – Fone (86) 215-5564 – Fone/Fax (86) 215-5560
E-mail: pesquisa@ufpi.br; pesquisa@ufpi.edu.br

**UTILIZAÇÃO DO LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP)
PARA A DETECÇÃO DE LEISHMANIA (L.) CHAGASI COMO MÉTODO DE
DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA**

Felipe Melo Nogueira (bolsista do PIBIC/UFPI), Ary Clênio de Oliveira Lima (colaborador, UFPI), Carlos Henrique Nery Costa (Orientador, Depto de Medicina Comunitária – UFPI)

INTRODUÇÃO

Leishmaniose Visceral Humana (LVH) é uma doença causada por parasitas do complexo *Leishmania donovani* (*L.(L.) donovani*, *L.(L.) infantum* e *L.(L.) chagasi*). Essa doença é endêmica em 62 países em sua maioria subdesenvolvidos. Estima-se que anualmente 5.000 mortes são ocorrem devido à LVH e 500.000 novos casos da doença sintomática são diagnosticados, sendo desses mais de 90% dos casos localizados em Bangladesh, Índia, Sudão e Brasil (BADARO, 1986). No Brasil, a LVH é causada pelo *L.(L.) chagasi*, com casos autóctones notificados em pelo menos 19 estados da federação distribuídos em quatro das cinco regiões, permanecendo indene apenas o Sul. Entre 1984 e 2000, foram notificados 67.231 casos. A Região Nordeste concentra mais de 90% das notificações, com registros de casos em todos os seus estados, o que transforma a LVH em um sério problema de saúde pública que ameaça a população e preocupa as autoridades sanitárias (QUEIROZ, 2004).

Recentemente foi desenvolvida um uma nova técnica de amplificação de DNA chamada *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) (NOTORI, 2000). A técnica usa quatro a seis *primers* que reconhecem seis a oito regiões da sequência alvo do DNA, essa sequência de *primers* atua em conjunto com a enzima *Bst polimerase* que tem a capacidade de deslocar fitas de DNA previamente formadas (PARIDA, 2008).

METODOLOGIA

Questões éticas: O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí sob o CAAE 0152.0.045.000-10, sendo aprovado em reunião dessa comissão no dia 30 de Julho de 2010. **Seleção dos pacientes:** Para realização trabalho experimental utilizamos amostras de sangue periférico de pacientes já cadastrados no Grupo de Pesquisa em Leishmaniose do Instituto de Doenças Tropicais Nathan Portela (IDTNP) que tenham previamente assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando o uso de seus materiais para as práticas do grupo. Os pacientes foram inicialmente separados em dois grupos utilizando como critério de seleção o diagnóstico do médico assistente no momento da alta hospitalar: o primeiro grupo contando os

pacientes que tiveram diagnóstico confirmado de LVH e um segundo com aqueles que tiveram o mesmo diagnóstico excluído. Os pacientes em que não houve uma definição sobre o diagnóstico da doença serão excluídos da pesquisa. Em cada um dos outros dois grupos foram escolhidos aleatoriamente 100 pacientes para participar da pesquisa. Essa seleção foi feita por uma pessoa não envolvida na pesquisa, de forma que o caráter positivo ou negativo da amostra não foi de conhecimento do grupo de pesquisa até o final da mesma. **Extração do DNA das amostras:** As amostras de sangue dos pacientes selecionados tiveram seu DNA extraído utilizando o *QIAamp DNA mini kit* (número de referência 51306; QUIAGEN) segundo especificações do fabricante. **Desenho e confecção dos primers:** Para a realização do LAMP, seguindo linhas de protocolos já publicados na literatura, foi amplificado o gene da DNA polimerase da *Leishmania (L.) chagasi*. Para isso, utilizamos um kit de *primers* desenhados com o auxílio do programa PrimerExplores V4 (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0>). **Real-time PCR:** Para confirmar o diagnóstico dos pacientes envolvidos todas as amostras foram submetidas à pesquisa de DNA de *Leishmania chagasi* utilizando *Real-time PCR*. **LAMP:** A reação do LAMP ocorreu de acordo com protocolos validados. Utilizamos em um volume total de 25µl, no qual estão presentes 50pmol de FIP e de BIP, 5pmol de F3 e de B3, 25pmol de FLP e de BLP, 40mM de Tris-HCl, 20mM de (NH₄)₂SO₄ 16mM de MgSO₄, 20mM de KCl, 2,8mM de dNTPs, 1,6M de Betaina (Sigma, St. Louis, MO, USA), 8U da enzima *Bst* DNA polimerase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) e 2µl da amostra de DNA. Essa amostra foi incubada em uma temperatura de 65°C por uma hora. Ao final do tempo previsto desnaturamos a enzima *Bst* DNA polimerase incubando a reação por 20 minutos a uma temperatura de 80°C. A detecção do produto da reação foi feita por eletroforese em gel de agarose. **Análise Estatística:** Ao final da pesquisa, cálculos específicos foram realizados de forma a avaliar a viabilidade do uso do LAMP como ferramenta diagnóstica para LVH, bem como os valores de sensibilidade e especificidade e valores preditivos do método.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando estudada após eletroforese em gel de agarose o sistema de amplificação de DNA do LAMP não identificou a presença de nenhuma amostra negativa amplificada. Entre as positivas, 46 das 100 amostras apresentaram bandas de amplificação de DNA com alto peso molecular. Turbidez a olho nu não foi observada em nenhuma amostra positiva ou negativa.

As variáveis clínico-epidemiológicas encontradas mostraram uma especificidade de 100%, porém uma sensibilidade de apenas 46%. O Valor Preditivo Positivo (VPP) encontrado foi de 100%, o Valor Preditivo Negativo (VPN) foi de 35,06% e a acurácia de 73%.

Foi observada também no gel de agarose a presença de uma nuvem de baixo peso molecular.

A ausência de turbidez visualizada a olho nu encontrada em nosso estudo contraria um dos principais pilares de defesa da utilização do LAMP como método diagnóstico molecular de fácil manipulação, uma vez que essa característica é o que lhe confere fácil interpretação e consequente possibilidade de utilização em ambientes sem estrutura laboratorial arrojada (THEKISOE, 2009). Essa observação, associada à baixa sensibilidade encontrada e à presença de uma nuvem de baixo peso molecular observada no gel de agarose (por ser uma estrutura de baixo peso molecular, acreditamos

que ela seja formada por restos de *primers* e desoxinucleotídeos trifosfato), sugere que a nossa reação tenha ocorrido com baixa eficiência, permitindo a permanência de *primers* e desoxinucleotídeos trifosfato no sistema com conseqüente baixo volume de DNA amplificado. Uma possível explicação para isso seria a natureza dos *primers* selecionados para nossas reações que possuíam uma temperatura de *melting* em torno de 50°C, enquanto nossas reações ocorriam em uma temperatura de 65°C. Essa diferença de temperaturas impede a hibridização adequada dos *primers* com o gene alvo, com uma conseqüente amplificação inadequada.

CONCLUSÃO

Pelo presente estudo foi possível concluir que a amplificação de DNA de *Leishmania (L) chagasi* utilizando o LAMP é uma técnica que pode ser utilizada como uma ferramenta para o diagnóstico da LVH. Pelo nosso estudo foi possível também determinar que esse método possua sensibilidade de 46%, especificidade de 100%, VPP de 100%, VPN de 35,06% e acurácia de 73%. Entretanto, mais estudos ainda são necessários para aperfeiçoar a metodologia com a correção das falhas encontradas.

APOIO

CNPq, CAPES, FAPEPI, UFPI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BADARO, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J Infect Dis** 1986; 154:1003.
2. QUEIROZ, M.J.A.; ALVES, J.G.B.; CORREIA, J.B.. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. **J. Pediatr. (Rio J.)** [online]. 2004, vol.80, n.2, pp. 141-146. ISSN 0021-7557. doi: 10.1590/S0021-75572004000200012.
3. BADARO, R.; JONES, T.C.; Lourenço B.. A Prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J Infect Dis**. 1986;154:639-49.
4. THEKISOE, O.M.M.; BAZIE, R.S.B.; CORONEL-SERVIAN, A.M.; SUGIMOTO, S.; KAWAZU, S.; INOUE, N.. Stability of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) reagents and its amplification efficiency on crude Trypanosome DNA templates. **J. Vet. Med. Sci.** 71(4): 471–475, 2009.
5. NJIRO Z.K., MIKOSZA, A.S.J. et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Rapid Detection of Trypanosoma brucei rhodesiense. **PLoS Negl Trop Dis** 2(2): e147. doi:10.1371/journal.pntd.0000147.
6. PARIDA, M. et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Rev. Med. Virol.** 2008; 18: 407–421.
7. NOTORI, T.; OKAIAMA, H. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic acids research**, 2000, vol. 28, No. 12.

PALAVRAS-CHAVE: Leishmaniose Visceral Humana. Diagnóstico Molecular. LAMP.
