



**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*

Resumo Projeto

AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS LAMP E REAL-TIME PCR NA DETECÇÃO DE DNA DE LEISHMANIA CHAGASI EM VETORES FLEBOTIMÍNEOS LUTZOMYIA LONGIPALPIS

Regina Silva Rabelo (ICV/CNPq), Vivianne Saraiva Leitão Viana (ICV/CNPq), Dilson Marreiros Nunes Filho (UFPI), Henrique Igor Gomes Lira (UFPI), Carlos Henrique Nery Costa (Orientador, Centro de ciências da Saúde –UFPI)

Palavras-chave: Leshmaniose. LAMP. Flebotomíneos

Introdução

A leishmaniose é um grupo de doenças enzoóticas e zoonóticas causadas pelo protozoário parasita do gênero *Leishmania*¹. Afeta mais de 12 milhões de pessoas em 88 países, dos quais 76 são países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento^{2,3}. Devido à alta incidência da doença e número de indivíduos com seqüelas desfigurantes ou fatais, a OMS incluiu a leishmaniose entre as seis mais importantes doenças do mundo⁴. A leishmaniose distribui-se no continente americano dos Estados Unidos ao nordeste da Argentina em duas formas clínicas distintas: a visceral e a cutânea¹. Juntas, somaram mais de 23 mil casos confirmados no Brasil em 2008, segundo do Ministério da Saúde.

É transmitida através da picada de várias espécies de insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos, que transmitem patógenos de animais para humanos reciprocamente. Assim, os vetores acrescentam risco adicional para a dispersão de patógenos de animais para seres humanos. Logo, a endemicidade da leishmaniose está associada com a distribuição e abundância de vetores flebotomíneos⁵. Fêmeas de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo, são os vetores dos protozoários *Leishmania*⁶. Ademais, a leishmaniose tem se tornado uma doença oportunista, desde que pacientes imunocomprometidos, como os pacientes de HIV, podem servir de reservatórios humanos, tornando o controle dessa doença ainda mais urgente⁷.

A detecção de espécies de *Leishmania* em flebotomíneos e a identificação das espécies de *Leishmania* e vetor artrópode são de suma importância para a previsão do risco e da expansão da doença em áreas endêmicas e circunvizinhas². O método de investigação de presença de *Leishmania* em flebotomíneos mais comum é a procura do parasita *in loco*, após dissecação do tubo digestivo do inseto, que é muito laborioso e requer grande habilidade e tempo por parte do microscopista¹. Além disso, muitas espécies e subespécies de protozoários flagelados são frequentemente indistinguíveis morfológicamente da *Leishmania* no estágio de promastigota, como o *Trypanosoma* e *Endotrypanum*, que também são albergados pelas fêmeas de flebotomíneos, o que complica sobremaneira o diagnóstico microscópico. Além disso, o isolamento do agente proveniente de insetos em meio de cultura, após positividade de diagnóstico microscópico, é muito susceptível a contaminação, além de moroso e trabalhoso, assim como a inoculação em animais de laboratório⁸.

Em vista disso, o emprego de técnicas moleculares, na atualidade, tem aumentado substancialmente a sensibilidade e especificidade da identificação do parasita, já que teoricamente um parasita *Leishmania* pode ser detectado em cada flebotomíneo⁹. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) é um novo método de amplificação de ácidos nucleicos que amplifica em um só passo o DNA com alta especificidade, eficiência e rapidez sob condições isotérmicas, o que dispensa uso de termociclador. A avaliação do resultado é feita a olho nu, o que torna o diagnóstico mais rápido e barato, pois dispensa eletroforese^{10,11}. O emprego de Real-time Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR) para estabelecer a infectividade de vetores artrópodes já foi relatado. O desenvolvimento do real-time PCR trouxe mensuração do ácido nucleico alvo através de um método preciso, acurado, rápido, relativamente fácil e de pouca contaminação e rápida normatização, alta especificidade e sensibilidade¹¹.

Real-time PCR e LAMP são métodos de diagnóstico apropriados para a avaliação de mosquitos infectados por patógenos, o que é essencial para o desenvolvimento de medidas de controle efetivas para Leishmaniose¹². Como a erradicação de reservatórios animais tem sido eticamente rejeitada, além da não aplicabilidade prática devido à ampla gama de reservatórios de *Leishmania*, a avaliação e controle de vetores artrópodes se tornaram o objetivo central de programas de eliminação de doenças zoonóticas causadas por vetor¹³. O presente trabalho tem por objetivo avaliar e padronizar o uso das técnicas LAMP e Real-time PCR na detecção de *Leishmania chagasi* em flebotomíneos, o que permitirá o emprego em campo dessas técnicas para avaliação de taxa de infectividade natural desses insetos.

Metodologia

De culturas de *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma spp.* e *Leishmania braziliensis* mantidas no Laboratório de Pesquisa do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela (IDTNP), foram extraídas amostras de DNA usadas nas reações empregando-se o QIAamp DNA mini kit (número de referência 51306; QUIAGEN) segundo especificações do fabricante.

Insetos hematófagos fêmeas da espécie *Lutzomyia longipalpis* (n= 129) obtidos de colônias mantidas no Laboratório de sanidade animal da UFPI foram divididos em dois grupos principais: o primeiro grupo foi mantido com alimentação artificial (Grupo A, n=62) e o segundo grupo foi alimentado em animais de laboratório e solução açucarada (Grupo B, n=62). Um pequeno grupo a parte de flebotomíneos (Grupo C, n=5) também foi alimentado artificialmente, como o Grupo A.

Todos os insetos dos Grupo A e C foram alimentadas com formas promastigostas de *Leishmania chagasi*. Os alimentadores artificiais (mamadeiras) foram acoplados à pele de pinto. Para a alimentação em animais, camundongos e hamsters foram anestesiados, mantidos restritos e expostos às fêmeas do Grupo B, previamente em jejum na ocasião de seu repasto sanguíneo.

Entre o quarto e quinto dia pós-alimentação, os flebotomíneos dos Grupos A e C foram lavados em solução detergente a 1% por 5 minutos e foram o tubo digestivo dissecado em solução salina, enquanto no Grupo B, os vetores foram apenas lavados em solução detergente. Para confirmação da infecção, os tubos digestivos dos insetos do grupo C foram examinados ao microscópio bacteriológico, com aumento de 400 vezes, para a identificação de formas promastigostas.

Para conservação, os insetos ou suas partes foram armazenados, imersos em 1.000µL de isopropanol, em tubos tipo eppendorf mantidos a temperatura ambiente.

Os vetores e suas partes tiveram seu DNA extraído utilizando o QIAamp DNA mini kit (número de referência 51306; QUIAGEN) segundo especificações do fabricante.

Para a realização do LAMP, seguindo linhas de protocolos já validados por outros trabalhos foi amplificada a região conservada do kDNA da *Leishmania chagasi*. A detecção e quantificação de *L. chagasi* foram feitas através de reações de PCR em tempo real, utilizando a tecnologia de sondas Taqman. Para a quantificação do número de parasitas foram utilizados os oligos e sonda desenhados a partir da seqüência do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania chagasi*.

Resultados e discussão

Um longo trabalho de importação de reagentes para realização do LAMP consumiu meses do calendário programado. Sendo assim, os bolsistas empenharam-se para trazer ao Piauí uma técnica pioneira e promissora de novo diagnóstico de Leishmaniose. Ao final, lograram êxito: todo o material reagente necessário agora está disponível no IDTNP.

A padronização do PCR Real-time foi realizada para culturas de *Leishmania sp.* mantidas no IDTNP. Chegou-se a seguinte padronização para tal: as reações são feitas com um volume final de 20µl. Na reação coloca-se 4,0µl de DNA da amostra, 0,50µl de Custom TaqMan Gene Expression

Assays (Applied Biosystems - ref. 4331348), composto por primers e sonda otimizados (20X), 10µl TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems - ref. 4369016) e 5,50µl de água ultra-pura estéril. Após desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, as amostras são sujeitas a 40 ciclos de amplificação constituídos por duas temperaturas: 15 segundos a 95° e 1 minuto a 60°C.

A reação do LAMP seguiu as especificações do LoopAmp DNA Amplification Kit (Eiken Chemical Co. Ltd., Japão). Um volume total de 25µl foi empregado para cada reação, 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 Betaine, 8U da enzima *Bst* DNA polimerase e 2µl da amostra de DNA. Essa amostra foi exposta a uma temperatura de 62°C em banho de água por uma hora. Ao final do tempo previsto a mistura teve sua temperatura elevada a 80°C durante quatro minutos de forma a finalizar a reação por desnaturação da enzima *Bst* DNA polimerase.

Referência Bibliográfica

1. MICHALSKY, EM *et al.* Assessment of PCR in the detection of Leishmania spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.44, n. 5, pp. 255-259, Set/Out. 2002.
2. KATO, H *et al.* Establishment Of A Mass Screening Method Of Sand Fly Vectors For Leishmania Infection By Molecular Biological Methods. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, v.77, pp. 324-329. 2007.
3. RANASINGHE, S *et al.* A real-time PCR assay to estimate Leishmania chagasi load in its natural sand fly vector Lutzomyia longipalpis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 102, n.9, pp.875-882. Setembro 2008.
4. NEVES, DP *et al.* Parasitologia humana. 11ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005.