

AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS LOOP ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) NA DETECÇÃO DE DNA DE *Leishmania chagasi* EM VETORES FLEBOTOMÍNEOS *Lutzomyia longipalpis*
Regina Silva Rabelo (bolsista do PIBIC/CNPq), Dr. Carlos Henrique Nery Costa (Orientador, Departamento Medicina Comunitária – UFPI), Teresinha de Jesus Cardoso Farias Pereira (colaboradora, UFPI), Fabiana Rebelo (colaboradora, UFPI)

Introdução

A OMS incluiu a leishmaniose entre as seis mais importantes doenças do mundo. É transmitida através da picada flebotomíneos. A endemicidade da leishmaniose está associada com a distribuição e abundância de vetores flebotomíneos.(NEVES, 2005) 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 circunvizinhas.

Em vista disso, o emprego de técnicas moleculares, na atualidade, tem aumentado substancialmente a sensibilidade e especificidade da identificação do parasita. 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 Leishmaniose. 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 vetor.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar e padronizar o uso da técnica LAMP e PCR na detecção de *Leishmania chagasi* em flebotomíneos, o que permitiria o emprego em campo dessas técnicas para avaliação de taxa de infectividade natural desses insetos.

Metodologia

De duas culturas de cepas de *Leishmania chagasi* foram extraídas amostras de DNA alvo a serem padronizados nas reações de amplificação gênica. Para a extração foi utilizado kit QIAamp da QIAGEN segundo as especificações do fabricante. Foi realizado a mensuração da concentração de ácidos nucleicos na amostra através do NanoDrop para confirmar e quantificar o DNA. Essas amostras de DNA, denominadas 3350 e 1921, foram utilizadas para a etapa de padronização dos protocolos de amplificação gênica, tanto o LAMP como PCR convencional. O protocolo utilizado para o PCR seguiu o já bem estabelecido e utilizado em diversas pesquisas realizadas no IDTNP. O LAMP seguiu as diretrizes publicadas em artigos de revisão (PARIDA, 2008). Esta etapa do projeto visa à padronização e à aplicabilidade das técnicas LAMP e PCR em nosso meio.

Flebotomíneos oriundos de cultivo em laboratório que nunca foram alimentados com sangue contaminado com parasitas do calazar tiveram o todo digestivo dissecado. O tubo digestivo masserados dos insetos foram então utilizados para padronizar as técnicas de amplificação gênica, utilizando como padrão positivo o trato intestinal dos insetos acrescidos de DNA de parasitas *Leishmania* e padrão negativo o masserado do inseto. Flebotomíneos que tiveram repasto sanguíneo com sangue contaminado por parasitas, seja por xenodiagnóstico em pacientes com calazar ou reservatório canino, também tiveram o todo digestivo dissecado e analisado à microscopia para visualização do parasita. Todos os insetos tiveram o tubo digestivo dissecado e analisado

previamente para presença ou não de parasitas a microscopia. Os que tiveram microscopia negativa foram igualmente submetidos à amplificação por LAMP e PCR, assim como os de microscopia positiva. Os produtos de amplificação foram então analisados pelo gel de agarose 0.5%. Essa etapa tem por objetivo comparar a acurácia do LAMP e PCR frente a um método já muito estabelecido na literatura, a microscopia.

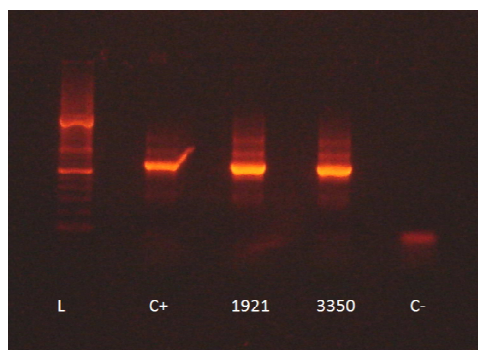
Resultados e Discussão

A padronização do LAMP de acordo com a sua aplicabilidade em nosso meio foi realizada, seguindo as orientações publicadas em artigo de revisão (PARIDA, 2008). A saber, foi o uso de 2 μ L de cada primer (BIP, FIP, F3, B3,FLP e BLP), totalizando 12 μ L de primers por reação, 2.5 μ L de solução tampão da Bst polimerase, 1 μ L de Bst polimerase, 3.5 μ L de solução de bases nitrogenadas a 10 μ M, 5 μ L de solução a 4M de betaína e 2 μ L de DNA alvo por reação. A reação de LAMP ocorre em 26 μ L ao total. O mix deve ser submetido a temperatura de 65°C por 60 minutos, quando de fato ocorre a reação, seguidos de 20 minutos a 80°C, onde a Bst polimerase é degradada para parar a reação (NOTOMI, 2000).

Da reação de PCR chegou-se ao protocolo de 14 μ L de água MilliQ ultra pura, 2.5 μ L de solução tampão, 1 μ L de MgCl₂, 1 μ L de cada primer (LIN19 e LINR4), 0.25 μ L de bases nucleotídeas e 0.20 μ L de Taq polimerase (platinum Taq). O tubo da reação é posto em termociclador para a amplificação gênica.

Os controles positivos utilizados nas reações são DNA extraído de cultura de parasitas. As imagens de gel de agarose obtidas em reações seriadas para padronização das técnicas foram muito semelhantes durante todo o processo. A agarose dos produtos de amplificação revelou excelente amplificação gênica, pois o controle positivo e as amostras de DNA padrão (3350 e 1921) mostraram-se fortemente positivos, em uma banda de tamanho específico de sequência gênica.

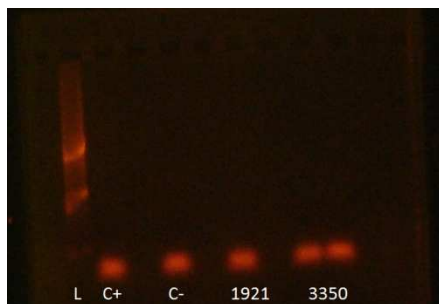
Figura 01: Fotografia do gel de agarose dos produtos de amplificação gênica do PCR padrão (sequência dos poços: Leader, Controle Positivo, amostra 1921, amostra 3350 e Controle Negativo)



Fonte: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela, 2012.

O gel de agarose resultante do LAMP mostrou banda forte em todos os poços, incluindo o controle negativo (C-). O que instigou a hipótese de não amplificação gênica, apesar do rígido protocolo elaborado em padrões dos maiores autores no assunto (PARIDA, 2008).

Figura 02: Fotografia do gel de agarose dos produtos de amplificação gênica do LAMP padrão.(sequência dos poços: Leadder, Controle Positivo, Controle Negativo, amostra 1921, amostra 3350)



Fonte: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela, 2012.

Tendo em vista a presença de banda fortemente positiva no Controle negativo, hipóteses foram levantadas: a não amplificação gênica através da técnica LAMP, sendo as bandas restos de bases nucleotídeas, Bst polimerase e tampões utilizados na reação. Bem como contaminação da reação pela água utilizada para substituir o DNA alvo na reação do Controle negativo. Já que todas as amostras ilustram bandas iguais na agarose; não houve contaminação gênica pela água MilliQ utilizada na reação, sendo assim, provavelmente o LAMP é infrutífero na amplificação.

Para que o LAMP deslanche como técnica de amplificação poderosa e prática ainda é necessária a sua correta padronização. Variáveis como concentração dos reagentes e, principalmente, temperatura da reação devem ser investigados como causa da não amplificação.

Conclusão

A padronização do LAMP em nosso meio encontra dificuldades operacionais por ser uma técnica elaborada e elegante. A padronização do PCR ocorreu sem maiores obstáculos. Como se faz necessária a padronização de ambas as técnicas de amplificação gênica para continuidade do projeto, se faz primor o êxito em aplicar o LAMP em nossas condições laboratoriais. Assim sendo, será possível realizar as reações com os flebotômíneos que se encontram prontos para serem utilizados.

Apoio: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela. Universidade Federal do Piauí. CNPq

Referências Bibliográficas

- 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.
- 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.
- 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.
- MAIA, C *et al.* Molecular of Leishmania infantum in naturally infected Phlebotomus perniciosus from Algarve Region, Portugal. *Journal Vector Borne Disease*, v.46, pp.268-272. Dez/2009.
- NOTOMI, T *et AL.* Loop-ediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 2000. Vol. 28, No. 12. April 15, 2000.
- NEVES, DP *et al.* Parasitologia humana. 11ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005.

Palavras-chave: Leishmaniose. LAMP. PCR.