

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES

Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Ana Emília Costa Araújo de Aquino

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA EM ALÇA
(LAMP) PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

RECIFE

2020

ANA EMÍLIA COSTA ARAÚJO DE AQUINO

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA EM ALÇA
(LAMP) PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador:

Dr. Fábio Lopes de Melo

Coorientadora:

Dr.^a Maria Almerice Lopes da Silva

Recife

2020

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

A657a	<p>Aquino, Ana Emília Costa Araújo de. Aplicação da técnica de amplificação isotérmica em alça (LAMP) para o diagnóstico da Leishmaniose visceral / Ana Emília Costa Araújo de Aquino. – Recife: [s.n.], 2020. 70 p.: il.; 30 cm.</p> <p>Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020. Orientador: Fábio Lopes de Melo; coorientadora: Maria Almerice Lopes da Silva.</p> <p>1. Leishmaniose visceral - diagnóstico. 2. Leishmania infantum. 3. Técnicas de Amplificação de Ácido Nucleico - métodos. 4. Sensibilidade e Especificidade. 5. Leishmania infantum – isolamento & purificação. 6. Técnicas de Diagnóstico Molecular - métodos. I. Melo, Fábio Lopes de. II. Silva, Maria Almerice Lopes da Silva. III. Título.</p>	CDU 578
-------	--	---------

ANA EMÍLIA COSTA ARAÚJO DE AQUINO

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA EM ALÇA
(LAMP) PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do
Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Data da aprovação: 16/10/2020

Banca Examinadora

Dr. Fábio Lopes de Melo

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr.^a Zulma Maria de Medeiros

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr.^a Elaine Christine de Souza Gomes

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

À minha mãe e aos meus avós maternos pela compreensão,
apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e por me conceder discernimento e sabedoria para que eu pudesse trilhar o meu caminho.

À minha mãe, Rute Costa, que sempre me apoiou, continuou enxergando potencial em mim nos momentos em que eu desacreditava da minha capacidade e esteve ao meu lado em todas etapas que me trouxeram até aqui.

Ao meu avó materno, Sr. José Costa, que foi como um pai para mim e que agora está no céu olhando por nossa família. À minha avó materna, Sr^a Liu, que apesar da idade avançada sei que sempre torceu e continua torcendo pela minha felicidade.

Ao meu orientador Fábio Lopes, por acreditar em meu potencial e por proporcionar meu desenvolvimento científico.

À Patrícia Sobral, por ter acreditado em mim desde o início e ter proporcionado os meios para o meu crescimento científico e, que apesar de não estar mais presente, sei que onde estiver estará feliz pela finalização deste ciclo.

Às minhas amigas de longo prazo, por todo apoio desde sempre e pelos momentos felizes que me proporcionaram ao longo da vida. Às amigadas que se iniciaram nesses dois anos de mestrado, sou grata por conhecer vocês e por estarem presentes na minha vida neste momento tão importante.

Aos pesquisadores do Laboratório de Doenças Transmissíveis e aos meus colegas: Dr.^a Zulma, Dr. Luydson, Walter, Elis, Alejandra, Sarah e Mércia por todo aprendizado, auxílio e momentos compartilhados ao longo desses anos.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, instituição financiadora, e a FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz, onde desenvolvi minhas atividades de pesquisa como bolsista.

Por fim, agradeço a todos que estiveram presentes nesse processo, que me ajudaram e me engrandeceram de alguma forma.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”.

(Carl Jung)

AQUINO, Ana Emília Costa Araújo de. **Aplicação da Técnica de Amplificação Isotérmica em Alça (LAMP) para o Diagnóstico da Leishmaniose Visceral**. 2020. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma infecção causada por protozoários do complexo *Leishmania donovani*, no Brasil o agente etiológico é a espécie *Leishmania infantum*, e encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo. O diagnóstico precoce desta parasitose é de grande importância, pois quando não tratados ou tratados tardiamente os casos têm maior letalidade. A visualização do parasito em amostras de punção de medula óssea é definida como método de diagnóstico padrão ouro, entretanto, é considerado um procedimento invasivo e necessita de ambiente adequado e profissionais capacitados. A técnica de Amplificação Isotérmica em Alça (LAMP) é um teste molecular de amplificação de DNA que não requer o uso de termocicladores, podendo ser realizado em banho-maria, pois toda a reação acontece a uma temperatura constante. Tendo em vista todas as vantagens do método LAMP, este estudo propôs a otimização e aplicação desta técnica para diagnóstico da LV em indivíduos residentes no município de Tamandaré, no estado de Pernambuco. Nesta pesquisa, foram coletadas amostras de sangue periférico de 83 indivíduos residentes do município em questão. Nos ensaios de otimização do LAMP foi avaliada a sensibilidade, sendo possível detectar o DNA de *Leishmania infantum* até a concentração de 100ag e, nos ensaios de especificidade, apenas amostras contendo DNA de *Leishmania infantum* foram positivas. Quando o sistema LAMP foi aplicado para o diagnóstico da LV nas amostras coletadas, não houve resultados positivos. Na aplicação da Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) utilizando o sistema ITS1 para diagnóstico da LV, todos os pacientes também foram negativos. A partir desta pesquisa, o sistema de LAMP pode ser considerado sensível e específico para detecção molecular de DNA de *Leishmania infantum* no Brasil. Estudos posteriores aplicando amostras clínicas positivas são necessários afim de definir a sensibilidade e especificidade analítica deste sistema.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. *Leishmania infantum*. Diagnóstico.

AQUINO, Ana Emília Costa Araújo de. **Application of a Loop-mediated Isothermal Amplification Technique (LAMP) for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis.** 2020. Dissertation (Academic Master's in Bioscience and Biotechnology at Health) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

ABSTRACT

The Visceral Leishmaniasis (VL) is an infection caused by protozoa from the *Leishmania donovani* complex and is among the six endemic diseases considered to be priority in the world. The early diagnosis of this parasitosis is of great importance, because when untreated or treated late, the cases are more lethal. The visualization of the parasite in bone marrow puncture samples is defined as a gold standard diagnostic method, however, it is considered an invasive procedure and requires an adequate environment and trained professionals. The Loop Isothermal Amplification (LAMP) technique is a molecular DNA amplification test that does not require the use of thermocyclers, and can be performed in a water bath, as the entire reaction takes place at a constant temperature. In view of all the advantages of the LAMP method, this study proposed the optimization and application of this technique for the diagnosis of VL in individuals living in the municipality of Tamandaré, in the state of Pernambuco. In this research, peripheral blood samples were collected from 83 individuals living in the municipality in question. In the LAMP optimization assays the sensitivity was evaluated, being possible to detect the *Leishmania infantum* DNA up to the concentration of 100 ag and, in the specificity tests, only samples containing *Leishmania infantum* DNA were positive. When the LAMP system was applied for the diagnosis of VL in the collected samples, there were no positive results. In the application of the Polymerase Chain Reaction (PCR) using the ITS1 system for the diagnosis of VL, all patients were also negative. From this research, the LAMP system can be considered sensitive and specific for molecular detection of *Leishmania infantum* DNA in Brazil. Further studies using positive clinical samples are necessary in order to define the sensitivity and analytical specificity of this system.

Keywords: Visceral leishmaniasis. *Leishmania infantum*. Diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fêmea de flebotomíneo adulto, ingurgitada.....	13
Figura 2 – Ciclo Biológico do gênero <i>Leishmania</i>	14
Figura 3 – Paciente com LV na fase aguda.....	16
Figura 4 – Paciente com LV no período de estado.....	17
Figura 5 – Paciente com LV no período final.....	17
Figura 6 – Localização do ITS-1 no DNA ribossomal.....	24
Figura 7 – Sequências das regiões do gene alvo.....	26
Figura 8 – Desenho dos <i>primers</i> do LAMP.....	26
Figura 9 – Etapa não-cíclica da reação do LAMP.....	28
Figura 10 – Etapas de ciclagem, de alongamento e reciclagem da reação do LAMP.....	29
Figura 11 – Adição dos <i>primers</i> de <i>loop</i> , BLP e FLP, na reação de LAMP.....	29
Figura 12 – Alteração da turbidez da amostra após a amplificação: tubo 1, a esquerda, positivo e tubo 2, a direita, negativo.....	30
Figura 13 – Representação do mecanismo de emissão de fluorescência pela calceína.....	31
Figura 14 – Alteração da cor da solução do tubo contendo calceína após o fim da reação. Resultado positivo, a esquerda (coloração verde) e resultado negativo a direita (coloração laranja).....	31
Figura 15 – Resultado da reação após a adição do SYBR Green I. A esquerda, tubo 1 positivo (coloração verde) e a direita, tubo 2 negativo (coloração laranja).....	32
Figura 16 – Alteração da cor da solução do tubo contendo azul de hidroxinaftol após o fim da reação. Tubo a esquerda, positivo (coloração azul-celeste) e a direita, negativo (coloração violeta).....	32
Figura 17 – Alteração da cor da solução do tubo contendo verde malaquita após o fim da reação. Tubo a esquerda positivo (coloração azul-claro) e a direita, negativo (incolor).....	33
Quadro 1 - Comparação entre os artigos publicados sobre desenvolvimento de um sistema de LAMP para diagnóstico da LV, no período de 2009 a 2019.....	34
Figura 18 – Limite de detecção do sistema ITS-1 PCR.....	42
Quadro 2 - Conjuntos de primers usados para amplificação de genes de kDNA no ensaio LAMP para <i>L. infantum</i>	43
Figura 19 – Resultados do primeiro ensaio de otimização do LAMP.....	45
Figura 20 – Resultados do segundo ensaio de otimização do LAMP.....	46
Figura 21 – Resultados do terceiro ensaio de otimização do LAMP.....	46

Figura 22 – Resultados do quarto ensaio de otimização do LAMP.....	47
Figura 23 – Resultados do quinto ensaio de otimização do LAMP à temperatura de 64°C.....	47
Figura 24 – Resultados do quinto ensaio de otimização do LAMP à temperatura de 65°C.....	48
Figura 25 – Resultados do quinto ensaio de otimização do LAMP à temperatura de 66°C.....	49
Figura 26 – Resultados do sexto ensaio de otimização do LAMP.....	49
Figura 27 – Resultados do sétimo ensaio de otimização do LAMP.....	50
Figura 28 – Resultados da otimização do LAMP.....	50
Figura 29 – Resultados da otimização do LAMP após alteração do MgSO ₄	51
Figura 30 – Resultados da otimização do LAMP utilizando a <i>Bst</i> 3.0 DNA polimerase.....	52
Figura 31 – Avaliação do limite de detecção da técnica de LAMP.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LV	– Leishmaniose Visceral
PKDL	– Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis
SFM	– Sistema Fagocítico Mononuclear
MS	– Ministério da Saúde
IFI	– Imunofluorescência Indireta
ELISA	– Ensaio Imunoenzimático
DAT	– Teste de Aglutinação Direta
rK39-ICT	– Teste Imunocromatográfico Rápido rK39
KAtex	– Teste de Aglutinação em Látex
PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase
DNA	– Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	– Desoxirribonucleotídeos
MgCl ₂	– Cloreto de magnésio
LAMP	– <i>Loop-mediated isothermal amplification</i>
FIP	– <i>Forward Inner Primer</i>
BIP	– <i>Backward Inner Primer</i>
F3	– <i>Forward Outer Primer</i>
B3	– <i>Backward Outer Primer</i>
FLP	– <i>Forward Loop Primer</i>
BLP	– <i>Backward Loop Primer</i>
<i>Bst</i>	– <i>Bacillus stearothermophilus</i>
Mg ²⁺	– Íons magnésio
Mn ²⁺	– Íons manganês
dsDNA	– DNA de fita dupla
Ca ²⁺	– Íons cálcio
pH	– potencial Hidrogeniônico
IgG	– Imunoglobulina G
pb	– pares de base
pmol	– picomol
mM	– milimolar
KCl	– Cloreto de potássio
(NH ₄) ₂ SO ₄	– Sulfato de amônio

MgSO ₄	– Sulfato de magnésio
M	– molar
U	– Unidade
μl	– microlitro
kDNA	– DNA do cinetoplasto
rDNA	– DNA ribossomal
ITS-1	– Espaçador interno transcrito 1
rRNA	– RNA ribossomal
VP	– Verdadeiros positivos
VN	– Verdadeiros negativos
ng	– nanograma
pg	– picograma
fg	– fentograma
ag	– actograma
CP	– Controle positivo
CN	– Controle negativo
TBE	– Tris-borato-EDTA
TAE	– Tris-acetato-EDTA
DMSO	– Dimetilsulfóxido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	09
2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL.....	11
2.1 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral.....	11
2.2 Classificação taxonômica.....	12
2.3 Formas de transmissão da LV.....	13
2.4 Ciclo biológico antroponozoonótico do gênero <i>Leishmania</i>	14
2.5 Manifestações clínicas e tratamento.....	15
2.6 Diagnóstico clínico-epidemiológico.....	19
2.7 Diagnóstico laboratorial.....	19
2.7.1 Exames parasitológicos.....	19
2.7.2 Diagnóstico imunológico.....	20
2.7.3 Diagnóstico molecular.....	22
2.8 Amplificação Isotérmica em Alça - LAMP.....	24
2.8.1 Definição.....	25
2.8.2 Desenho dos <i>primers</i>	26
2.8.3 Etapas da reação.....	27
2.8.4 Visualização dos resultados.....	30
2.8.5 Aplicação da LAMP para o diagnóstico da LV.....	33
3 JUSTIFICATIVA.....	36
4 PERGUNTA CONDUTORA.....	37
5 HIPÓTESE.....	38
6 OBJETIVOS.....	39
6.1 Objetivo geral.....	39
6.2 Objetivos específicos.....	39
7 METODOLOGIA.....	40
7.1 Desenho de estudo.....	40
7.2 Área de estudo.....	40
7.3 População de estudo.....	40
7.4 Critérios de inclusão e exclusão.....	40
7.5 Coleta de dados.....	41
7.6 Avaliação laboratorial.....	41
7.6.1 Extração e purificação do DNA genômico e das amostras.....	41

7.6.2 PCR convencional.....	41
7.6.3 Amplificação Isotérmica em Alça – LAMP.....	42
7.6.3.1 <u>Desenho dos primers</u>	42
7.6.3.2 <u>Otimização das condições de amplificação</u>	43
7.6.3.3 <u>Visualização dos resultados</u>	43
7.6.3.4 <u>Determinação do limite de detecção</u>	44
7.6.3.5 <u>Determinação da especificidade</u>	44
7.7 Considerações éticas.....	44
8 RESULTADOS.....	45
8.1 Otimização do sistema de LAMP para diagnóstico da LV.....	45
8.2 Avaliação da sensibilidade do sistema LAMP.....	52
8.3 Avaliação da especificidade do sistema LAMP.....	53
9 DISCUSSÃO.....	54
10 CONCLUSÕES.....	57
11 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	67
ANEXO B – PARECER DO CEP.....	69

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada por protozoários do complexo *Leishmania donovani* (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). Essa infecção é considerada um problema de saúde pública e está entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo, acometendo anualmente quase dois milhões de pessoas (ALVARENGA *et al.*, 2010). O diagnóstico precoce desta parasitose é de grande importância, pois quando não tratados ou tratados tardiamente os casos têm maior letalidade, o que é um fato preocupante principalmente nas áreas endêmicas afastadas dos grandes centros e que possuem carência de recursos, onde normalmente há falta de profissionais capacitados para a realização do diagnóstico (DOURADO *et al.*, 2007).

A pesquisa microscópica das formas amastigotas do parasito em esfregaços realizados a partir de punções de linfonodos, medula óssea e baço continua sendo o método diagnóstico definido como padrão ouro (FAUCHER; PIARROUX, 2011; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019). Entretanto, este procedimento é considerado invasivo, apresentando contraindicações como, por exemplo, pacientes com contagem de plaquetas menor do que 40.000 plaquetas/ μ L não podem realizar o aspirado esplênico. Além disso, essa metodologia também necessita de ambiente adequado e profissionais capacitados (SILVA; STEWART; COSTA, 2005; SUNDAR; RAI, 2002). Outra forma de diagnóstico laboratorial são os ensaios imunológicos, porém, esses métodos possuem limitações em termo de especificidade e reprodutibilidade, sendo relatadas reações cruzadas com agentes causadores de outras doenças infecciosas como leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, esquistossomose e tuberculose (PAVLI; MALTEZOU, 2010; SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

No que diz respeito ao diagnóstico molecular, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica considerada eficaz, até quando realizada a partir de uma única molécula de DNA (MELO, 2006). Contudo, as técnicas baseadas em PCR requerem instrumentos de alta precisão, como o termociclador, e métodos elaborados para detecção dos produtos de amplificação, além de possuir grande potencial para contaminação laboratorial sendo, muitas vezes, inviável sua implementação em laboratórios de países em desenvolvimento (ADAMS *et al.*, 2010; PARIDA *et al.*, 2008).

A técnica de Amplificação Isotérmica em Alça (do inglês *Loop-mediated isothermal amplification* – LAMP) descrita por Notomi *et al.* (2000), é uma ferramenta para diagnóstico molecular simples e prática para detecção e identificação de doenças infecciosas, sendo aplicado com sucesso no diagnóstico da tripanossomíase africana, malária, giardíase,

criptosporidiose, entre outras (GAO *et al.*, 2015; PARIDA *et al.*, 2008; VERMA *et al.*, 2017). Essa técnica que consiste, basicamente, na amplificação isotérmica do DNA alvo utilizando seis *primers* diferentes, sendo dois *primers* internos (FIP e BIP), dois *primers* externos (F3 e B3) e dois *primers* que hibridizam na alça formada (FLP, BLP), especialmente desenhados para amplificar oito regiões no gene alvo (PARIDA *et al.*, 2008). O uso destes seis *primers* aumenta a especificidade do teste ao mesmo tempo em que melhora a velocidade da reação (BOEHME *et al.*, 2007).

Após a amplificação, o resultado pode ser observado no próprio tubo, sendo assim, ideal para monitoramento a olho nu ou análise por espectrofotômetro (PARIDA *et al.*, 2008). Considerando as vantagens da rápida amplificação, operação simples, baixo custo, alta sensibilidade e fácil detecção, além de ser altamente específico, o LAMP tem aplicações potenciais para diagnóstico clínico, assim como para vigilância de doenças infecciosas em países em desenvolvimento, sem que haja requerimento de equipamentos sofisticados (MORI; NOTOMI, 2009; PARIDA *et al.*, 2008).

Tendo em vista todas as vantagens do método LAMP, este estudo propôs a otimização e aplicação desta técnica para diagnóstico da LV, visando a sua posterior implementação em laboratórios de diagnóstico clínico e sistemas de vigilância em saúde.

2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

As leishmanioses são um grupo de infecções causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, que pertencem à ordem Kinetoplastida e à Família *Trypanosomatidae*. Dependendo do tropismo dos parasitos, essas infecções podem apresentar-se em quatro formas: leishmaniose cutânea, mucocutânea, visceral e post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). Os fatores que definem o tipo de manifestação clínica são inerentes às espécies infectantes e a saúde, constituição genética e imunidade do hospedeiro (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007). Nas suas diversas formas afetam populações de cerca de 98 países espalhados pelos 5 continentes (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017).

2.1 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como Calazar, é uma infecção causada por protozoários que pertencem ao complexo *Leishmania donovani* (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). Por ser uma das doenças mais negligenciadas no mundo, a LV é considerada um problema de saúde pública, cuja incidência anual está estimada em 200 a 400 mil casos afetando cerca de 12 milhões de homens, mulheres e crianças ao redor do mundo. Além disso, mais de 350 milhões de pessoas vivem em risco e mais de 2 milhões de novos casos surgem a cada ano, por esta razão, encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (ABBASI *et al.*, 2016; ALVARENGA *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2019; VERMA *et al.*, 2017).

No Brasil, sua ocorrência estava limitada a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, mas, atualmente, encontra-se disseminada em áreas urbanas de grande e médio porte, sendo uma endemia de franca expansão geográfica. Há registros de casos em 21 das 25 unidades da Federação, atingindo as cinco regiões brasileiras (BRASIL, 2008, 2012, 2014). Esse processo de urbanização da LV surge como consequência de alterações ambientais, assim como da intensa migração de indivíduos residentes de áreas rurais para áreas urbanas, mais especificamente para periferias, onde não há infraestrutura e saneamento básico adequado, propiciando condições favoráveis à presença do vetor nesses locais (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008).

O nordeste brasileiro é a região mais acometida e responde por cerca de 50% dos casos no país. No período de 2005 a 2014, somente no estado de Pernambuco, foram registrados 2.408 casos e, destes, ocorreram 95 óbitos (PERNAMBUCO, 2016).

Por se tratar de uma doença de caráter endêmico no estado de Pernambuco, a LV está incluída entre as doenças negligenciadas consideradas prioritárias pelo Programa Sanar, instituído pela Secretaria Estadual de Saúde. Este programa tem como objetivo eliminar ou reduzir a ocorrências de infecções transmissíveis e negligenciadas, que persistem como problema de saúde pública (PERNAMBUCO, 2020). Dentro as cidades do estado, o município de Tamandaré foi considerado pelo Programa Sanar - através do Plano Integrado para Enfrentamento às Doenças Negligenciadas (2015-2018) - um dos municípios prioritários para enfrentamento da LV, por apresentar no período de 2010 a 2014 um risco de transmissão considerado alto, com ocorrência de óbitos (PERNAMBUCO, 2015).

2.2 Classificação taxonômica

Três espécies de *Leishmania* pertencem ao complexo *Leishmania donovani*, são elas: a *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e a *Leishmania (Leishmania) donovani* (DOURADO *et al.*, 2007).

No Novo Mundo, a *L. (L.) chagasi* é a espécie de importância epidemiológica, entretanto, existe um conflito sobre qual espécie é a de fato predominante. As teorias divergem em relação ao surgimento da LV nas Américas, pois caso ela tenha sido introduzida recentemente durante o período de colonização europeia, o agente etiológico seria *L. (L.) infantum* (espécie com maior incidência na Europa) porém, se a infecção se desenvolveu juntamente com a introdução dos canídeos na região, há milhões de anos atrás, neste caso, seria a *L. (L.) chagasi* a espécie epidêmica, caracterizando uma origem autóctone (BRASIL, 2014; GONTIJO; MELO, 2004; NEVES, 2011).

Em seu estudo, Cunha e Chagas (1938) consideram que a *L. (L.) chagasi* é morfologicamente indêntica a *L. (L.) infantum* e, posteriormente, outros autores identificaram através de métodos genéticos e enzimáticos que essas espécies estão estritamente relacionadas, devendo ser consideradas como sinônimas (MAURICIO *et al.*, 2000). Contudo, outra corrente científica defende que, devido às suas características genótípicas e fenotípicas, as espécies devem ser consideradas como diferentes, classificando-as em duas subespécies: *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (L.) infantum infantum* (LAINSON; RANGEL, 2005).

A corrente científica mais aceita atualmente é a que considera a *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* como espécies sinônimas, tendo prioridade o uso da nomenclatura *L. (L.) infantum* para se referir ao agente etiológico da LV no Novo Mundo. Esta nomenclatura é a que deve ser utilizada, até que numa nova classificação taxonômica seja proposta. (DANTAS-TORRES, 2006; MAURICIO *et al.*, 2000).

2.3 Formas de transmissão da LV

A depender da espécie, a LV apresenta aspectos clínicos e epidemiológicos distintos. A espécie *L. (L.) donovani* tem transmissão restrita aos seres humanos (antropose), é responsável pela leishmaniose cutânea pós-calazar em adultos e tem maior incidência na Índia, Bangladesh, Nepal e leste da África. Já a espécie *L. (L.) infantum* ocasiona a forma antroponótica onde, primariamente, ocorre uma zoonose em que os canídeos são os principais reservatórios domésticos, apresentando maior incidência nas Américas, Região do Mar Mediterrâneo, Europa, África e China (MOLINA *et al.*, 2003; NEVES, 2011). O Brasil representa mais de 95% dos casos na América Latina (MACHADO *et al.*, 2019).

A forma antroponótica de transmissão ocorre através de insetos vetores denominados flebotomíneos, também conhecidos popularmente como mosquito palha (BRASIL, 2014). Esses vetores, definidos como os hospedeiros invertebrados, são dípteros que pertencem à família *Psychodidae* e constituem a subfamília *Phlebotominae* (Figura 1).

Figura 1 - Fêmea de flebotomíneo adulto, ingurgitada.



Fonte: Brasil (2014)

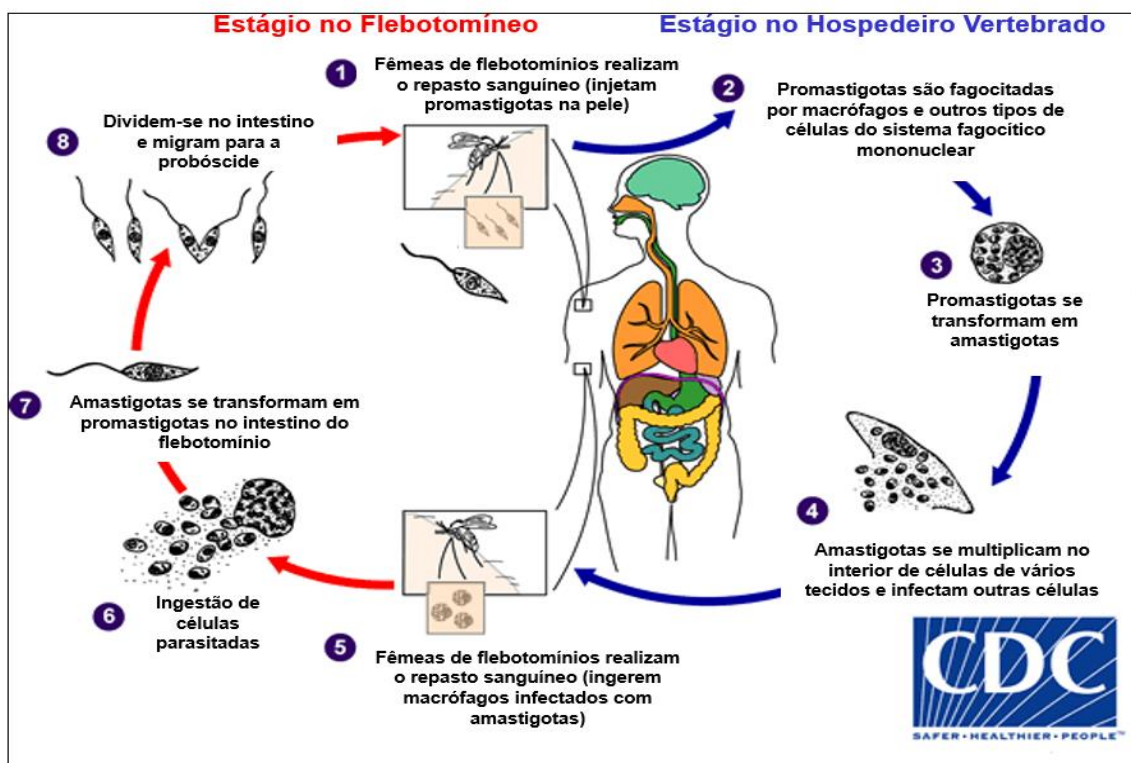
Dentre os gêneros que estão incluídos nesta família e subfamília, somente dois são considerados relevantes: o gênero *Phlebotomus* e o gênero *Lutzomyia*, este último sendo o responsável pela transmissão da LV nas Américas (REY, 2013). No país, a *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* são as duas espécies responsáveis pela transmissão da infecção,

sendo a *Lutzomyia longipalpis* facilmente encontrada no interior de domicílios e em abrigos de animais domésticos (BRASIL, 2014; CHAPPUIS *et al.*, 2007). Na área urbana, os reservatórios são os cães (*Canis familiaris*), sendo estes a principal fonte de infecção nas grandes cidades, enquanto que no ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (BRASIL, 2016).

2.4 Ciclo biológico antrozoontótico do gênero *Leishmania*

O ciclo biológico do gênero *Leishmania* é digenético, ou seja, o parasito se apresenta em duas formas: uma forma flagelar promastigota, encontrada no intestino do vetor, e uma forma amastigota, que evolui intracelularmente no homem, o hospedeiro mamífero (Figura 2) (CHAPPUIS *et al.*, 2007; FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012).

Figura 2 - Ciclo Biológico do gênero *Leishmania*.



Fonte: Adaptado do Centers for Disease Control and Prevention (2018)

A infecção no vetor tem início a partir do momento em que as fêmeas, ao realizarem o repasto sanguíneo em mamíferos infectados, ingerem macrófagos e monócitos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania*. No trato digestivo anterior do inseto, ocorre o rompimento

das células liberando as amastigotas. Essas amastigotas livres se reproduzem através de divisão binária e se diferenciam nas formas flageladas, as promastigotas, que também se multiplicam por divisão binária e logo após esse processo se transformam em paramastigotas. As paramastigotas colonizam o esôfago e a faringe do vetor, permanecendo aderidas ao epitélio e depois se diferenciam em promastigotas metacíclicas (formas infectantes para o hospedeiro vertebrado homem ou animal). O ciclo do parasito no vetor ocorre em um período de aproximadamente 72 horas (BRASIL, 2014; NEVES, 2011).

Ao realizarem um novo repasto sanguíneo, as fêmeas liberam a saliva do inseto contendo as promastigotas metacíclicas. No hospedeiro vertebrado, o parasito é fagocitado/internalizado por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) como: macrófagos do baço, da medula óssea e dos linfonodos, células dendríticas, neutrófilos e principalmente por células de Kupffer do fígado que são atraídos para a região da picada na pele (BRASIL, 2014; FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012; REY, 2013).

Uma vez no interior destas células, os parasitos são capazes de sobreviver em vacúolos (fagolisossomos) por meio de uma complexa interação parasita-hospedeiro. Dentro dos vacúolos, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se por divisão binária exaustivamente até o rompimento da célula hospedeira. Os parasitos liberados disseminam-se por meio dos sistemas linfático e vascular, infectando outras células como monócitos e macrófagos, resultando em: infiltração da medula óssea, hepatoesplenomegalia e linfonodos aumentados (BRASIL, 2014; CHAPPUIS *et al.*, 2007; FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012; REY, 2013).

O período de transmissibilidade do vetor irá depender do tempo em que persistir o parasitismo na pele ou no sangue circulante dos animais reservatórios (BRASIL, 2010).

2.5 Manifestações clínicas e tratamento

A LV é uma doença crônica e sistêmica. O período de incubação no homem é bastante variável, podendo ser de 10 dias a 24 meses. Após o período de incubação, o indivíduo infectado pode apresentar manifestações, de modo gradual, como: febre de longa duração, perda de peso e de apetite, astenia, adinamia e anemia, entre outros sintomas que caracterizam uma infecção sistêmica persistente e, sintomas como gânglios linfáticos aumentados, baço e fígado que indicam a ocorrência de invasão parasitária no sangue (CHAPPUIS *et al.*, 2007). O desenvolvimento das manifestações clínicas da LV está diretamente relacionado a parâmetros como: desequilíbrio entre a multiplicação dos parasitos no interior de células do SFM; resposta imune do hospedeiro e o processo inflamatório. Do ponto de vista didático e

considerando a evolução clínica dessa infecção, optou-se por sua classificação em períodos: período inicial, período de estado e período final (BRASIL, 2010).

O período inicial, também denominado de “fase aguda”, é o período onde é possível identificar o início dos sintomas, que variam de indivíduo para indivíduo. Contudo, em grande parte dos casos, ocorre: febre alta e contínua, com duração inferior a quatro semanas e associada a calafrios, palidez cutâneo mucosa e hepatoesplenomegalia discretas (Figura 3). Em geral, nesta fase, o estado do paciente está preservado (BRASIL, 2014; NEVES, 2011).

Figura 3 - Paciente com LV na fase aguda.



Fonte: Brasil (2014)

Em regiões em que a LV é endêmica, crianças podem apresentar manifestação clínica discreta (febre baixa e leve palidez cutaneomucosa), de curta duração (15 dias) e que geralmente evolui para a cura espontânea, caracterizando a forma oligossintomática da doença, que pode ser confundida com outras infecções (BRASIL, 2010, 2014).

No período de estado ocorre febre irregular associada a manifestações como: emagrecimento progressivo, palidez cutânea mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia, o que pode causar distensão abdominal e dor (Figura 4). Este quadro clínico apresenta evolução mais lenta durando cerca de dois meses, levando a um comprometimento geral na maioria dos casos (BRASIL, 2014; CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Figura 4 - Paciente com LV no período de estado.



Fonte: Brasil (2014)

De modo geral, se o diagnóstico e consequente tratamento da doença não for realizado, a infecção progride para o período final, onde há persistência da febre e comprometimento grave do estado geral do paciente (Figura 5). O indivíduo passa a apresentar indícios de desnutrição como: cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca. É comum a ocorrência de hemorragias incluindo epistaxe, gengivorragia e petéquias. Outros sintomas comuns neste período são: edema dos membros inferiores, icterícia e ascite. Quando não tratada, o óbito pode ocorrer em 90% dos casos e geralmente ocorre em consequência de coinfeções bacterianas, sangramentos e/ou anemia grave (BRASIL, 2010, 2014).

Figura 5 - Paciente com LV no período final.



Fonte: Brasil (2014)

Em áreas endêmicas, infecções assintomáticas ocorrem em uma proporção de 5 a 10 vezes maior do que os casos de que se manifestam clinicamente. No Brasil, a forma assintomática é a mais frequente (SAPORITO *et al.*, 2013; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). Em relação ao ciclo de transmissão da LV, o papel dos indivíduos portadores da infecção assintomática ainda é desconhecido. De acordo com um estudo realizado no Brasil, publicado por Costa *et al.* (2000), indivíduos infectados pela espécie *L. infantum*

provavelmente não são infecciosos para o vetor, por apresentarem baixa ou indetectável parasitemia.

Contudo, caso os indivíduos assintomáticos apresentem algum fator de risco - desnutrição, condições genéticas e outras doenças infecciosas – pode ocorrer a evolução da doença, ocasionando a manifestação clínica dessa infecção (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). A infecção pelo HIV, por exemplo, aumenta de 100 a 2300 vezes as chances de desenvolver manifestações clínicas da LV, em áreas que apresentam endemicidade (EZRA; OCHOA; CRAFT, 2010).

A depressão do sistema imunológico pode ser considerada uma das consequências da LV, principalmente nos estágios avançados da doença ou, pode se tornar mais grave pela associação da infecção com outras comorbidades, como a coinfeção com HIV, indivíduos transplantados que fazem uso de imunossupressores e em pacientes portadores de doenças autoimunes. Essas condições, além de reduzirem a capacidade da resposta imunológica, também permitem a reincidência da doença (AKUFFO *et al.*, 2018; SAPORITO *et al.*, 2013).

As manifestações clínicas de indivíduos coinfectados com HIV são semelhantes às de indivíduos não infectados pelo vírus. Entretanto, a grande diferença entre esses dois grupos, se encontra no fato de que o primeiro apresenta uma menor taxa de resposta ao tratamento e, como consequência, também apresentam uma alta taxa de reincidência da LV (LÓPEZ-VÉLEZ, 2003). Em indivíduos transplantados, também são frequentes as múltiplas reincidências. Isto se deve, principalmente, ao quadro clínico da LV ser semelhante a outras infecções, o que pode gerar um diagnóstico inadequado, atrasando o início do tratamento correto (ANTINORI *et al.*, 2008; SAPORITO *et al.*, 2013).

No Brasil, os fármacos de escolha para o tratamento da LV são o antimoniato pentavalente e a anfotericina B. Entretanto, na decisão de qual fármaco será utilizado, deve-se levar em consideração fatores como: faixa etária, presença de gravidez e morbidades. Os antimoniais pentavalentes (antimoniato de N-metil glucamina) são recomendados pelo Ministério da Saúde (MS) como os medicamentos de primeira escolha, exceto em alguns casos (mulheres grávidas nos dois primeiros trimestres de gestação e pacientes com insuficiência renal ou hepática, por exemplo) onde se recomenda a utilização da anfotericina B, em sua formulação lipossomal (BRASIL, 2010, 2016).

Os critérios de cura para a LV são basicamente critérios clínicos, sendo observado a curto e longo prazo: desaparecimento da febre; redução da hepatoesplenomegalia; melhora nos parâmetros hematológicos; retorno do apetite e melhora do estado geral. O paciente devidamente tratado deve ser acompanhando durante os três, seis e 12 meses após o

tratamento e na última avaliação é considerado curado se estiver com o quadro estável (BRASIL, 2016).

2.6 Diagnóstico clínico-epidemiológico

Em se tratando do diagnóstico da LV, segundo o MS, a confirmação da doença tem como critério no aspecto clínico-laboratorial: febre, astenia, adinamia, anorexia, perda de peso/caquexia, hepatoesplenomegalia, micropoliadenopatia, anemia, gengivorragias, epistaxes, equimoses e petéquias. Entretanto, este diagnóstico clínico é de difícil conclusão, pois os sinais e sintomas do Calazar se confundem com os de outras enfermidades, como: esquistossomose, hepatite, malária, toxoplasmose aguda e doenças hematológicas e autoimunes, principalmente na fase inicial da doença (BRASIL, 2008; NEVES, 2011).

Por se tratar de uma doença grave, de curso crônico e de alta letalidade - caso não seja tratada -, a LV exige um diagnóstico precoce, o que é um fato preocupante principalmente nas áreas endêmicas afastadas dos grandes centros e que possuem uma carência de recursos, onde normalmente há falta de profissionais capacitados dificultando o acesso dessa população ao diagnóstico (DOURADO *et al.*, 2007). Em consequência, muitas vezes são aplicados para diagnóstico apenas critérios básicos como características clínicas e aspectos epidemiológicos (BRASIL, 2008).

2.7 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da LV consiste basicamente em: exames parasitológicos, testes sorológicos, detecção de antígenos e identificação do DNA da *Leishmania* (TLAMCANI, 2016). Devido as suas características clínicas e por se tratar de uma doença de notificação compulsória o diagnóstico laboratorial deve ser realizado de forma precoce e precisa (BRASIL, 2016).

2.7.1 Exames parasitológicos

A busca microscópica da *Leishmania* permanece como o padrão ouro no diagnóstico da LV devido à sua alta especificidade (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019). Esta técnica demonstra as formas amastigotas do parasito, geralmente observados dentro de células fagocíticas (FAUCHER; PIARROUX, 2011). Os esfregaços são realizados a partir da punção

de linfonodos, medula óssea e baço, sendo observada uma variação de positividade dependendo da amostra usada e, a sensibilidade irá depender do tecido utilizado (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; VERMA *et al.*, 2017).

Os esfregaços do baço possuem a melhor sensibilidade variando entre 93,1-98,7%, enquanto que os de medula óssea e linfonodo têm menor sensibilidade com 52-85% e 52-58%, respectivamente (SRIVASTAVA *et al.*, 2011). A alta variação de sensibilidade na punção da medula óssea pode estar relacionada à distribuição da densidade parasitária do indivíduo, que pode apresentar um nível de parasitemia escasso, moderado ou forte, já tendo sido relatada uma baixa sensibilidade desta técnica em amostras de pacientes com baixa carga parasitária (ADAMS *et al.*, 2010; SILVA; STEWART; COSTA, 2005). Essas punções são consideradas procedimentos invasivos, com contraindicações (pacientes com anemia severa, tendência a sangramento e mulheres grávidas não podem realizar aspirado esplênico, por exemplo) e exigem ambientes e profissionais habilitados para a coleta, tornando-se, desta forma, inadequadas para estudos epidemiológicos e, algumas vezes, também para diagnósticos individuais (DESJEUX, 2004; SILVA; STEWART; COSTA, 2005; SUNDAR; RAI, 2002).

Quando a escassez de parasitos dificulta a busca microscópica, o aspirado deve ser semeado em meio NNN (Novy e McNeal modificado por Nicolle), LIT (Liver Infusion Triptose) ou Schneider. As culturas são incubadas a 24-26°C e examinadas após 5, 7 ou 10 dias. Entretanto, caso permaneçam negativas, deve-se repicar outro meio após 15 dias, sendo a demora na obtenção de resultados a maior deficiência desta técnica (FERREIRA; MORAES, 2013; REY, 2013)

A cultura sofre as mesmas dificuldades da microscopia, por utilizar uma amostra obtida através de um procedimento invasivo, apresentar variações na sensibilidade e necessitar de expertise profissional, além de ser uma técnica demorada e de alto custo. Isto a torna pouco requisitada para o diagnóstico, sendo raramente utilizada na rotina da prática clínica, com aplicação mais frequente em laboratórios de pesquisa (NEVES, 2011; SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

2.7.2 Diagnóstico imunológico

Uma ampla gama de métodos imunológicos, variando em sensibilidade e especificidade, estão disponíveis para o diagnóstico da LV. Os métodos imunológicos são aqueles nos quais é possível identificar a presença de anticorpos ou de antígenos. Os que

detectam anticorpos são chamados de testes sorológicos e se baseiam na resposta humoral específica, podendo ser classificados em: testes específicos e não específicos (SRIVASTAVA, *et al.*, 2011). Entre esses métodos, os principais são: o Teste de Imunofluorescência Indireta (IFI), o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), o Teste de Aglutinação Direta (DAT) e o Teste Imunocromatográfico Rápido rK39 (rK39-ICT) (PAVLI; MALTEZOU, 2010).

No Brasil, o Programa de Vigilância e Controle da LV fornece o rK39-ICT para o diagnóstico da LV. Além disso, são vendidos comercialmente kits para realização do IFI e do ELISA, enquanto que para o DAT, ainda não existe kit comercial disponível no país, sendo aplicado principalmente em pesquisas (FREIRE *et al.*, 2019). É importante ressaltar que os resultados dos testes sorológicos devem ser interpretados juntamente com o contexto do histórico clínico e epidemiológico do paciente (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A IFI se baseia na detecção de anticorpos anti-*leishmania* utilizando como antígenos as formas promastigotas fixadas em lâminas. Esses anticorpos podem ser detectados na fase inicial da doença e se tornam indetectáveis de seis a nove meses após o tratamento (TLAMCANI, 2016). Em uma revisão sistemática sobre o desempenho de testes sorológicos para o diagnóstico de LV, a IFI demonstrou uma sensibilidade fraca entre 11-82% e especificidade um pouco maior entre 79-100% (SARKARI; REZAEI; MOHEBALI, 2018). Entretanto, a principal limitação desta técnica é que podem ser observadas reações cruzadas em indivíduos infectados por outros tripanossomatídeos como leishmaniose tegumentar e doença de Chagas e, também em pacientes com malária e tuberculose (NEVES, 2011; SARKARI; REZAEI; MOHEBALI, 2018).

O ELISA vem sendo aplicado para o diagnóstico da LV e, a sua sensibilidade e especificidade variam de acordo com o antígeno empregado. Uma variedade de antígenos recombinantes pode ser utilizada, sendo o rK39 o mais aplicado, apresentando uma sensibilidade de 67-100% e especificidade de 93-100% (TLAMCANI, 2016). Em decorrência da necessidade de uma equipe qualificada, equipamento sofisticado e eletricidade, o ELISA não é comumente utilizado na prática clínica para o diagnóstico de LV em regiões endêmicas (SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

O DAT é uma técnica altamente específica e simples, apresentando taxa de sensibilidade 92-100% e de especificidade 72-100%. Entretanto, as principais deficiências do DAT são a necessidade de tempo de incubação relativamente longo, múltiplas pipetagens e, os antígenos utilizados demandam um custo alto, além de apresentar reação cruzada com outros tripanossomatídeos (SARKARI; REZAEI; MOHEBALI, 2018). Sua aplicação é

restrita no que diz respeito à avaliação da eficácia do tratamento, pois permanece positivo por um extenso período mesmo após a cura clínica (até 5 anos em mais de 50% dos casos de LV) já que os anticorpos permanecem detectáveis por um longo tempo. Além disso, entre 20 a 30% dos indivíduos saudáveis que residem em áreas endêmicas para LV apresentam resultado positivo no DAT (GHASEMIAN *et al.*, 2014; SRIVASTAVA, 2011).

O desenvolvimento das tiras imunocromatográficas que utilizam o antígeno K39 foi um grande passo no diagnóstico da LV e tornaram-se bastante populares, sendo aplicadas em larga escala nos últimos anos. Porém, o rK39-ICT sofre da mesma desvantagem do DAT: permanecer positivo por um longo período em indivíduos saudáveis de regiões endêmicas mesmo após o tratamento (SRIVASTAVA *et al.*, 2011; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019). Atualmente, os testes baseados na proteína rK39 que estão validados para uso clínico são: o Kalazar Detect (Inbios, Seattle, Estados Unidos), o IT-LEISH® (BioRad, Marnes-la-Coquette, França) e o OnSite™ (CTK Biotech, Califórnia, Estados Unidos) (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019).

O Teste de Aglutinação em Látex (KAtex) trata-se de um método imunológico de diagnóstico em que há a detecção de antígeno na urina, tem sido apontado como um método diagnóstico sendo capaz de detectar a doença ativa e tornando-se negativo após o tratamento. O teste foi avaliado em diferentes áreas endêmicas e apresentou especificidade variando entre 80-100% e sensibilidade considerada pobre a moderada, variando de 40-95%. (SARKARI; REZAEI; MOHEBALI, 2018).

Como descrito anteriormente, os métodos imunológicos possuem limitações em termo de especificidade e reprodutibilidade, sendo relatadas reações cruzadas com agentes causadores de outras doenças como leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, esquistossomose e tuberculose (SRIVASTAVA *et al.*, 2011). Além disso, possuem a incapacidade de diferenciar entre uma infecção ativa e assintomática e a permanência de um resultado positivo após a cura, o que as tornam incapazes de prever a eficiência do tratamento (SRIVASTAVA *et al.*, 2011; VERMA *et al.*, 2013).

2.7.3 Diagnóstico molecular

Nas últimas décadas diversas ferramentas moleculares foram desenvolvidas para suprir as lacunas existentes nos métodos imunológicos e parasitológicos. Entre estas ferramentas, está a amplificação *in vitro* de uma sequência de ácido nucléico específica para um patógeno. Tais abordagens podem permitir um diagnóstico rápido com um aumento da sensibilidade e

especificidade, comparáveis ou até melhor do que os métodos clássicos utilizados (ADAMS *et al.*, 2010; MORI; NOTOMI, 2009). As principais técnicas utilizadas são a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e suas variantes: a PCR quantitativa (qPCR), Nested PCR e PCR multiplex (PARIDA *et al.*, 2008).

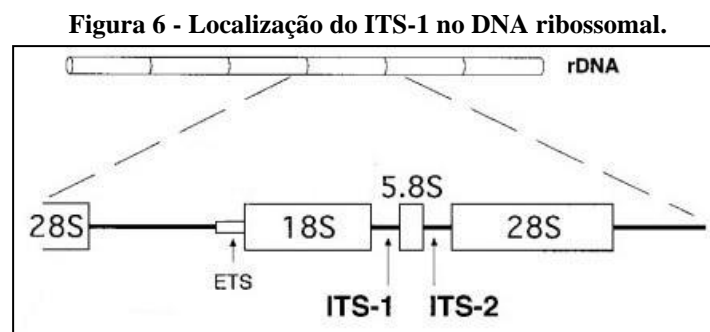
A técnica de PCR é considerada eficaz até quando realizada a partir de uma única molécula de DNA (MELO, 2006), tornando possível detectar baixas cargas parasitárias (FAUCHER; PIARROUX, 2011). Progressos em técnicas que se baseiam na PCR têm sido aplicados para o diagnóstico da LV, ao longo dos últimos anos. Diversos protocolos de PCR têm sido desenvolvidos para detecção múltipla e diferenciação de parasitos, como a PCR triplex, PCR multiplex, análise de polimorfismo de comprimento fragmento de restrição (RFLP) e Nested PCR. (VERMA *et al.*, 2013; VERMA *et al.*, 2017). Para estas técnicas, normalmente são utilizadas amostras de sangue periférico, sem necessitar da realização de procedimentos invasivos para a coleta de amostras biológicas (GHASEMIAN *et al.*, 2014).

Este método baseia-se em ciclos que ocorrem em diferentes temperaturas de incubação em um mesmo tubo, na presença de reagentes termoestáveis e sequências específicas de DNA a serem amplificadas (BASTIEN; PROCOP; REISCHL, 2008). Para que a reação ocorra, o tubo deve conter o DNA com a sequência alvo a ser amplificada, uma enzima DNA polimerase termoestável, no mínimo dois (na PCR Multiplex o número é acima de dois) oligonucleotídeos iniciadores também chamados de *primers*, desoxirribonucleotídeos (dNTPs), tampão de reação e cloreto de magnésio (MgCl₂). Todos esses componentes são misturados em proporções padronizadas, colocados em microtubos juntamente com o DNA extraído de amostras biológicas. Esse sistema será submetido a um protocolo de ciclagem (mudanças de temperatura necessárias para que aconteça a amplificação) que ocorrerá em um termociclador. A primeira etapa do ciclo ao qual a mistura dentro do tubo será submetida, é a desnaturação do DNA pela elevação da temperatura a 90-95°C. Em seguida, com a diminuição da temperatura para 45-65°C, ocorre o anelamento dos *primers* à molécula de DNA alvo e, por fim, a última etapa do ciclo é a extensão da cadeia da região alvo do DNA, onde a enzima DNA polimerase atua numa faixa de temperatura de 68-72°C. Esse ciclo é repetido várias vezes, resultando em milhares de cópias do DNA alvo (Biologia Molecular Básica, 2014).

As técnicas baseadas em PCR são consideradas um dos principais métodos de diagnóstico da LV devido a sua alta taxa de sensibilidade e especificidade. Ao longo dos anos, diversas regiões do genoma da *Leishmania* foram estudadas para fornecer *primers* específicos e sensíveis para a diagnóstico da LV pela técnica de PCR. Entre essas regiões, pode-se citar:

kDNA, rRNA e o Espaçador Interno Transcrito 1 (ITS-1) do DNA ribossomal (rDNA) (TLAMCANI, 2016).

O ITS-1 é uma região não codificadora, que se localiza entre a região codificadora de RNA ribossômico (rRNA) 18S e a região codificadora de rRNA 5.8S que codificam ssu rRNA, produzindo um fragmento de 300 a 350 pares de bases, a depender da espécie de *Leishmania spp* (Figura 6) (POLANCO *et al.*, 1998; SILVA, 2012).



Fonte: Adaptado de Polanco *et al.* (1998)

Nesse contexto de diagnóstico de LV pela técnica de PCR, o alvo mais utilizado é o ITS-1, sendo largamente aplicado para diagnóstico dessa infecção, assim como também é utilizado em estudos de caracterização molecular de espécies do gênero *Leishmania* (BARBOSA JÚNIOR, 2016; SCHÖNIAN; KUHL; MAURICIO, 2011).

Contudo, as técnicas baseadas em PCR requerem instrumentos de alta precisão e métodos elaborados para detecção dos produtos de amplificação, necessidade de tempo para análise após a PCR, expertise técnica e além de possuir grande potencial para contaminação laboratorial sendo, muitas vezes, inviável a sua implementação em laboratórios de países em desenvolvimento (ADAMS *et al.*, 2010; PARIDA *et al.*, 2008).

2.8 Amplificação Isotérmica em Alça – LAMP

A técnica de Amplificação Isotérmica em Alça (do inglês *Loop-mediated isothermal amplification* – LAMP) descrita por Notomi *et al.* (2000), é um teste simples que não requer o uso de termocicladores (POON *et al.*, 2006), o que tem atraído muita atenção para esta técnica de amplificação de nucleotídeos potencialmente rápida, acurada e com um bom custo-benefício.

2.8.1 Definição

O LAMP tem muitas características que o torna adequado para uma detecção simples e rápida de ácidos nucleicos (MORI; NOTOMI, 2009). É uma técnica que consiste, basicamente, na amplificação isotérmica do DNA alvo utilizando três pares de *primers* diferentes, sendo dois *primers* internos (*Forward Internal Primer* - FIP e *Backward Internal Primer* - BIP), dois *primers* externos (*Forward Outer Primer* - F3 e *Backward Outer Primer* - B3) e dois *primers* que hibridizam no *loop* (*Forward Loop Primer* - FLP, *Backward Loop Primer* - BLP), especialmente desenhados para amplificar oito regiões do gene alvo (PARIDA *et al.*, 2008). O par externo hibridiza na região alvo do DNA e o par interno se liga a regiões internas da zona hibridizada pelo par externo (NOTOMI *et al.*, 2000). O uso destes seis *primers* aumenta a especificidade do teste ao mesmo tempo em que melhora a velocidade da reação e são especialmente projetados para permitir a formação de estruturas em haste e alça (ABBASI *et al.*, 2016; BOEHME *et al.*, 2007; VERMA *et al.*, 2017).

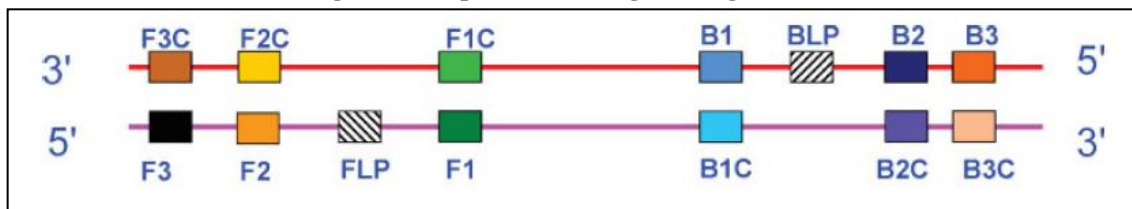
Algumas substâncias presentes em amostras clínicas e alguns fluidos biológicos (plasma, soro, urina) são capazes de inibir a reação da PCR e, por este motivo, a extração de DNA é indispensável para a qualidade dos resultados, já que a PCR é mais sensível a esses inibidores do que o LAMP (KANEKO *et al.*, 2007). Esse fato permite que seja utilizado como fonte de DNA para LAMP amostras parcialmente processadas ou não processadas, sendo possível dispensar a etapa de extração de DNA, que tende à contaminação, além de ocorrer perda significativa de DNA. Assim, a eliminação desta etapa reduz tempo de processamento e custos para reação de LAMP (NJIRU, 2012).

Este método utiliza uma enzima chamada *Bacillus stearothermophilus* (*Bst*) DNA polimerase. A *Bst* DNA polimerase foi primeiramente isolada por Stenesh e Roe (1972), que descreveram o método de purificação e as propriedades desta enzima extraída da bactéria termofílica *Bacillus stearothermophilus* e, relataram em seu estudo, que a *Bst* DNA polimerase se apresentava mais termoestável em comparação a outra enzima, oriunda do *Bacillus licheniformis*, com uma temperatura ótima em torno de 65°C (STENESH; ROE, 1972). A *Bst* DNA polimerase é ativada apenas em temperaturas relativamente altas, o que reduz a possibilidade de ligações não específicas entre os *primers* e torna a reação mais tolerante a inibidores presentes em amostras clínicas, que são capazes de impedir a reação de PCR convencional (ABBASI *et al.*, 2016; KHAN *et al.*, 2012).

2.8.2 Desenho dos *primers*

Cada um dos *primers* internos, FIP e BIP, apresentam duas sequências distintas que correspondem às sequências sense e antisense do DNA alvo: uma sequência hibridiza à região do gene alvo do DNA na primeira fase da reação e a outra tem a função de autohibridizar nas fases seguintes (NOTOMI *et al.*, 2000). As sequências de regiões do gene alvo são denominadas da seguinte forma na fita de DNA sentido 3'-5': as regiões F3c, F2c, F1c na extremidade 3' e as regiões B1, BLP, B2 e B3 na extremidade 5'. No sentido 5'-3', na extremidade 5' estão as regiões F3, F2, FLP e F1 e, na extremidade 3', se encontram as regiões B1c, B2c e B3c (Figura 7) (PARIDA *et al.*, 2008).

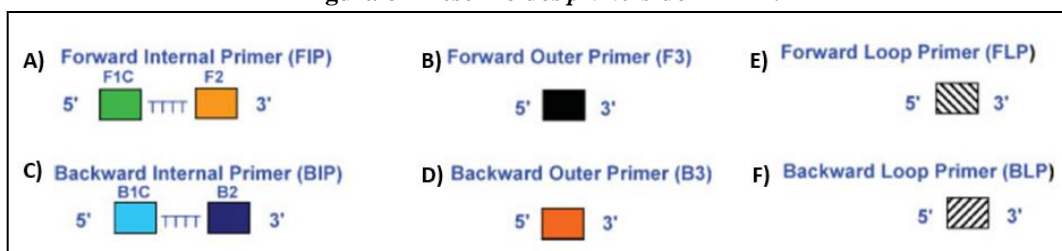
Figura 7 - Sequências das regiões do gene alvo.



Fonte: PARIDA *et al.* (2008)

O FIP é formado pela região F1c (localizada na extremidade 5' do primer) e pela F2 (localizada na extremidade 3'), que é complementar à região F2c do gene alvo (Figura 8A). O *primer* F3 é formado pela região F3 do gene alvo que é complementar à região F3c (Figura 8B). O BIP consiste na região B2 (localizada na extremidade 3' do *primer*) que é complementar à região B2c, e também é formado pela região B1c (localizada na extremidade 5') (Figura 8C). O B3 é formado pela região B3 do gene alvo que é complementar à região B3c (Figura 8D). Os *primer* FLP e BLP são formados por sequências complementares às sequências localizadas entre as regiões F1 e F2 e B1 e B2, respectivamente (Figura 8E e F) (NOTOMI *et al.*, 2000; PARIDA *et al.*, 2008).

Figura 8 - Desenho dos *primers* do LAMP.



Fonte: Adaptado de PARIDA *et al.*, 2008

Para que os *primers* utilizados no LAMP sejam desenhados corretamente é necessário seguir alguns critérios como: entre as regiões F1c e F2 do FIP deve existir um espaçador TTTT, assim como entre as regiões B1c e B2 do *primer* BIP (Figura 8A e C). Além disso, todos os *primers* devem apresentar conteúdo GC em torno de 50 a 60% do seu total e conteúdo AT em torno de 40 a 50% do seu total. Esses critérios, entre outros, tem o objetivo de projetar os *primers* para que sejam incapazes de formar estruturas secundárias facilmente (NOTOMI *et al.*, 2000; PARIDA *et al.*, 2008).

2.8.3 Etapas da reação

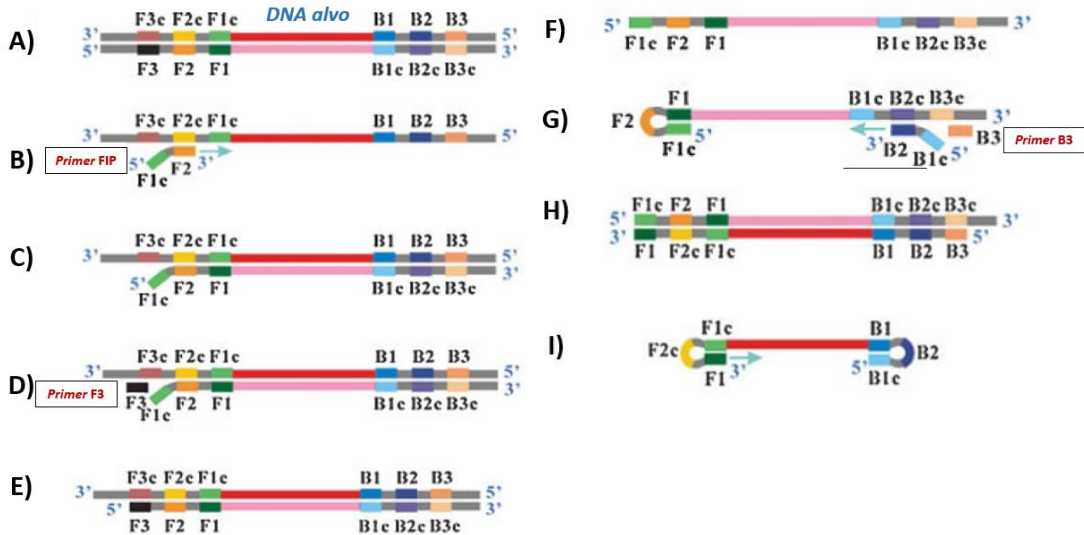
A reação de LAMP é uma amplificação isotérmica, portanto, ocorre a uma temperatura constante que varia de 63°C a 65°C e é dividida em três etapas: etapa não-cíclica, etapa de ciclagem e etapa de alongamento e reciclagem. A reação tem início apenas quando todas as regiões do DNA alvo são reconhecidas corretamente pelos *primers*. Em se tratando da reação, primeiramente deve ocorrer a hibridação dos *primers* internos, em detrimento dos externos, que só hibridizam às suas zonas complementares posteriormente, fazendo com que a enzima *Bst* DNA polimerase abra a fita dupla de DNA que se encontra a sua frente (GILL; GHAEI, 2008; MORI; NOTOMI, 2009; PARIDA *et al.*, 2008).

A etapa não-cíclica é a de formação de produto para as fases seguintes. Inicialmente, uma nova fita de simples de DNA é sintetizada pela ação da *Bst* DNA polimerase, tendo como molde a sequência de sentido 3'-5' complementar do DNA alvo. A síntese tem início na extremidade 3', a partir da ligação da região F2 do *primer* interno FIP à sua região complementar F2c no DNA alvo (Figura 9B e C) (NOTOMI *et al.*, 2000; PARIDA *et al.*, 2008).

Em seguida, o *primer* externo F3 hibridiza à sua região complementar F3c, levando a formação de uma nova fita e liberando a fita complementar ligada ao FIP (Figura 9D, E e F). Na extremidade 5' da fita simples liberada, ocorrerá autohibridização pela ligação da região F1c à região F1 do *primer* FIP, formando uma estrutura em *loop* em uma extremidade (Figura 9G). Esta cadeia simples com a estrutura em *loop* servirá de modelo para a síntese de uma nova fita de DNA. A partir da ligação da região B2 do *primer* BIP à região B2c do DNA molde, ocorrendo a síntese de uma nova fita desfazendo a estrutura em *loop*. Posteriormente, haverá a ligação do *primer* B3 à região B3c levando à síntese de uma nova fita de DNA, liberando àquela sintetizada anteriormente pela ligação do *primer* BIP (Figura 9G e H). Esta fita simples liberada após a ligação do *primer* B3, irá se autohibridizar formando estrutura em

loop em ambas as extremidades 3' e 5' (Figura 9I). Este é estrutura principal que servirá como molde para as etapas seguintes de amplificação (NOTOMI *et al.*, 2000; PARIDA *et al.*, 2008; TOMITA *et al.*, 2008).

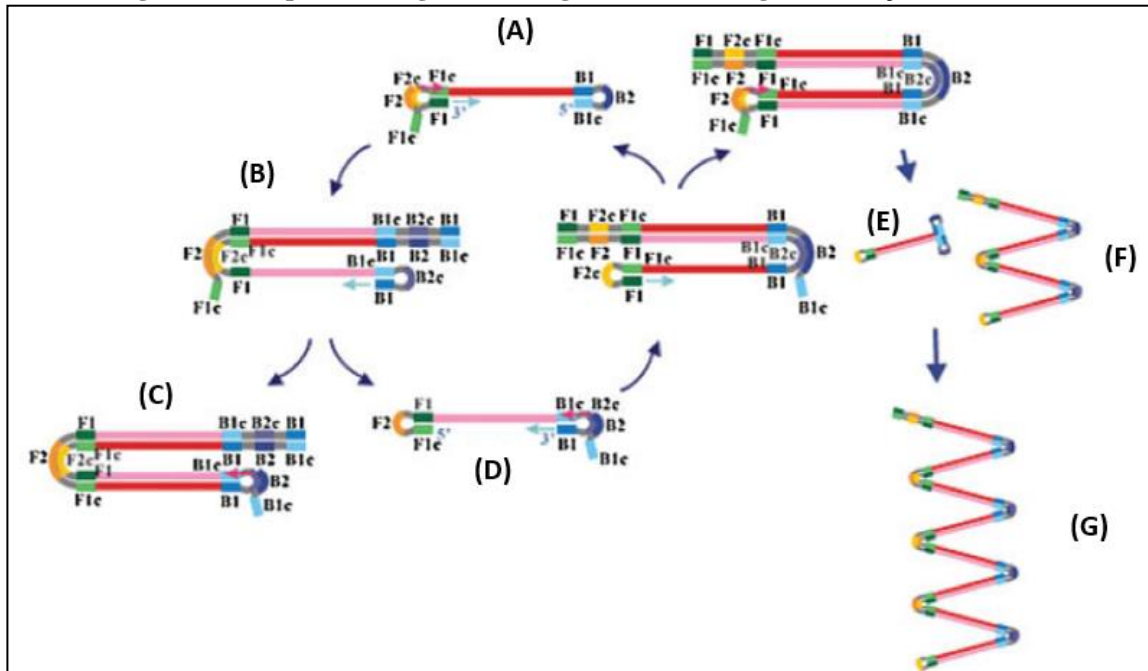
Figura 9 - Etapa não-cíclica da reação do LAMP.



Fonte: Adaptado de PARIDA *et al.* (2008)

Na etapa seguinte, denominada etapa de ciclagem, o FIP irá hibridizar na estrutura em *loop* da extremidade 3' pela ligação da região F2 do *primer* à região F2c do gene alvo, ocorrendo em seguida a formação de uma nova fita de DNA por meio da síntese por deslocamento de cadeia (Figura 10A e B). Posteriormente, o *primer* BIP irá hibridizar na estrutura em *loop* da extremidade 5' pela ligação da região B2 do *primer* à região B2c do gene alvo, ocorrendo a síntese de uma nova fita por deslocamento de cadeia e consequentemente liberando da fita produzida anteriormente pela ligação do FIP na extremidade 3' (Figura 10C e D). Essa nova fita produzida, possui regiões complementares, sendo capaz de se autohibridizar em ambas as extremidades, formando uma estrutura semelhante ao um haltere (Figura 09D) (NOTOMI *et al.*, 2000; PARIDA *et al.*, 2008).

Figura 10 - Etapas de ciclagem, de alongamento e reciclagem da reação do LAMP.

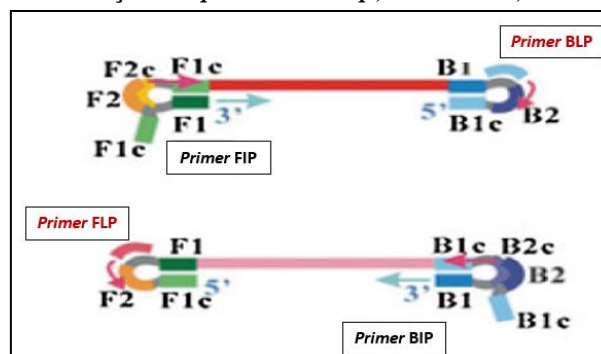


Fonte: Adaptado de PARIDA *et al.* (2008)

Essa estrutura em haltere serve como molde para a etapa seguinte de alongamento e reciclagem. Como resultado desta última etapa, além dessa estrutura semelhante a um haltere, também há a formação de outras estruturas resultando em produtos finais de diversos comprimentos que são repetições alternadas e invertidas da sequência do gene alvo (Figura 10D, F e G) (NOTOMI *et al.*, 2000; PARIDA *et al.*, 2008).

No método original da amplificação do DNA pela técnica de LAMP descrito por Notomi *et al.* (2000) não havia a presença dos primers de *loop* na reação. Contudo, Nagamine, Hase e Notomi (2002) descreveram um método mais rápido adicionando os dois primers de *loop*, o FLP e BLP, que são capazes de acelerar a reação reduzindo o tempo de amplificação (Figura 11) (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; NOTOMI *et al.*, 2000).

Figura 11 - Adição dos primers de *loop*, BLP e FLP, na reação de LAMP.



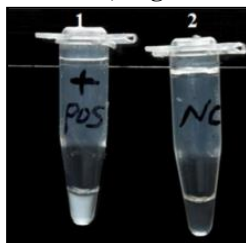
Fonte: Adaptado de PARIDA *et al.* (2008)

O LAMP tem a capacidade de amplificar poucas cópias de DNA para 10^9 moléculas em aproximadamente uma hora, sob condições isotérmicas (ABBASI *et al.*, 2016).

2.8.4 Visualização dos resultados

A reação de amplificação de DNA pela técnica de LAMP pode ter um tempo de duração de 15 a 60 minutos (PARIDA *et al.*, 2008). Após a amplificação, o resultado pode ser observado no próprio tubo, dispensando o uso da eletroforese em gel de agarose, necessária para visualizar os produtos da PCR convencional, eliminando as chances de contaminação dessa etapa (KHAN *et al.*, 2012). Os produtos do LAMP podem ser detectados visualmente pela turvação, fluorescência e alteração de cor dos produtos, ideal para monitoramento a olho nu ou análise por espectrofotômetro (SRIWORARAT *et al.*, 2015). A turbidez vista ao fim da reação de LAMP ocorre devido à formação de um precipitado branco decorrente da acumulação de pirofosfato de magnésio, em uma concentração diretamente proporcional à quantidade de produtos amplificados (Figura 12) (PARIDA *et al.*, 2008).

Figura 12 - Alteração da turbidez da amostra após a amplificação: tubo 1, a esquerda, positivo e tubo 2, a direita, negativo.



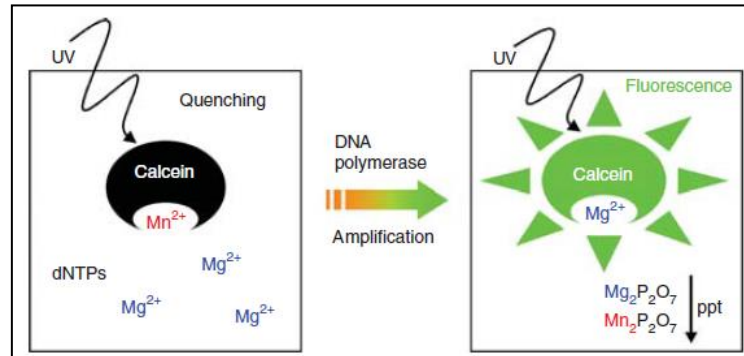
Fonte: GHASEMIAN *et al.* (2014)

Adicionalmente, para observação destes resultados através da fluorescência podem ser utilizados os corantes *SYBR Green I* ou a calceína, reagentes de baixo custo que potencializam a observação da turbidez da amostra.

A calceína se trata de um reagente quelante de detecção de fluorescência, capaz de formar complexos com íons Mg^{2+} (magnésio) durante a reação de amplificação (FANG *et al.*, 2018). Nesse caso, é utilizada como um indicador de metal fluorescente e o íon metálico usado é o Mn^{2+} (manganês). Antes do início reação, a calceína é combinada com os íons Mn^{2+} e ambos são adicionados ao tubo de reação (PARIDA *et al.*, 2008; TOMITA *et al.*, 2008). No início da reação, a coloração do tubo se apresenta laranja porque a fluorescência da calceína é inibida pela sua combinação com os íons Mn^{2+} . À medida que a reação avança, a calceína é

privada de íons Mn^{2+} pelos íons de pirofosfato de magnésio produzidos durante a amplificação, resultando na emissão da sua fluorescência (Figura 13) (ZHU *et al.*, 2009).

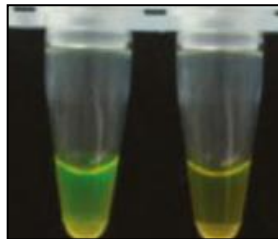
Figura 13 - Representação do mecanismo de emissão de fluorescência pela calceína.



Fonte: TOMITA *et al.* (2008)

Se após a reação a cor do tubo alterar de laranja para coloração verde, é indicativo de que ocorreu a amplificação do DNA alvo (Figura 14) (PARIDA *et al.*, 2008).

Figura 14 - Alteração da cor da solução do tubo contendo calceína após o fim da reação. Resultado positivo, a esquerda (coloração verde) e resultado negativo a direita (coloração laranja).

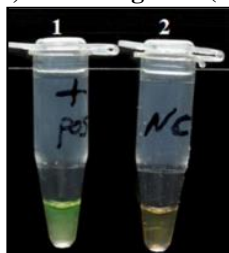


Fonte: FANG *et al.* (2018)

O *SYBR Green I*, desde sua introdução a partir dos anos 90, tem sido aplicado em larga escala em diversas técnicas de análise e detecção do DNA devido às suas propriedades como alta sensibilidade e seletividade para DNA de fita dupla (dsDNA) (DRAGAN *et al.*, 2012; ZIPPER *et al.*, 2004).

Quando se utiliza o *SYBR Green I*, em caso de a amplificação ser positiva, a cor laranja do corante se transformará em verde e essa mudança de cor pode ser observada sob luz natural, assim como sob luz ultravioleta (302 nm), se não tiver ocorrido amplificação a cor permanecerá laranja (Figura 15). A conversão de cor é permanente podendo ser mantida para fins de registro (PARIDA *et al.*, 2008). Diferentemente da calceína, o *SYBR Green I* é adicionado após a reação para evitar a ligação não específica deste corante a qualquer dsDNA presente na amostra (NJIRU, 2012).

Figura 15 - Resultado da reação após a adição do SYBR Green I. A esquerda, tubo 1 positivo (coloração verde) e a direita, tubo 2 negativo (coloração laranja).



Fonte: GHASEMIAN *et al.* (2014)

Um dos métodos mais simples para detecção dos produtos amplificados é a medição colorimétrica pelo azul de hidroxinaftol e o verde malaquita. O azul de hidroxinaftol é um reagente indicador de íons de metal, sendo utilizado como indicador colorimétrico para detecção e quantificação de íons Ca^{2+} (cálcio), em pH 13.0 e íons Mg^{2+} em pH 10.0 (GOTO *et al.*, 2009). Na reação de LAMP ocorre a produção de grandes quantidades de íons pirofosfato que reagem com íons Mg^{2+} levando a formação de moléculas de pirofosfato de magnésio. Nesse sentido, à medida que a reação avança a concentração de íons Mg^{2+} diminui.

O azul de hidroxinaftol é considerado um novo método de medição colorimétrica para o LAMP pela sua propriedade de detectar alterações na concentração de íons Mg^{2+} na reação. Além disso, é apropriado para o uso em laboratórios devido ao seu baixo risco de contaminação, devendo ser adicionado ao tubo no início da reação (GOTO *et al.*, 2009; TRANGONI *et al.*, 2015).

A cor do azul de hidroxinaftol altera de acordo com a mudança do pH da solução. Se após a reação o tubo apresentar uma cor violeta, é indicativo de que a reação é negativa e caso o tubo apresentar uma cor azul-celeste é indicativo de resultado positivo (Figura 16). A alteração da cor ocorre devido à quelatação de íons Mg^{2+} por dNTPs e o pH da solução é alcalino, pois a *Bst* DNA polimerase sintetiza o DNA em soluções de caráter básico (GOTO *et al.*, 2009; TRANGONI *et al.*, 2015).

Figura 16 - Alteração da cor da solução do tubo contendo azul de hidroxinaftol após o fim da reação. Tubo a esquerda, positivo (coloração azul-celeste) e a direita, negativo (coloração violeta).



Fonte: Adaptado de GOTO *et al.* (2009)

A medição colorimétrica também pode ser feita através do verde malaquita. Este reagente é um intercalante de DNA e sua coloração é considerada mais fácil de ser interpretada e altamente consistente. Além da vantagem de ser de baixo custo, esse reagente não precisa ser congelado podendo ser armazenado a temperatura ambiente, o que aumenta a sua aplicabilidade para o LAMP. (NZELU *et al.*, 2014; SRIWORARAT *et al.*, 2015). Caso tenha ocorrido amplificação, a solução do tubo apresentará coloração azul-claro, característica do verde malaquita, sendo interpretado este resultado como positivo. Não tendo ocorrido amplificação, a solução do tubo se apresentará transparente caracterizando um resultado negativo (Figura 17) (SRIWORARAT *et al.*, 2015).

Figura 17 - Alteração da cor da solução do tubo contendo verde malaquita após o fim da reação. Tubo a esquerda positivo (coloração azul-claro) e a direita, negativo (incolor).



Fonte: Adaptado de NZELU *et al.* (2014)

2.8.5 Aplicação da LAMP para o diagnóstico da LV

A LAMP é uma ferramenta simples e prática para detecção e identificação de doenças infecciosas. Considerando as vantagens da rápida amplificação, operação simples, baixo custo, alta sensibilidade e fácil detecção, além de ser altamente específico, a LAMP tem aplicações potenciais para diagnóstico clínico, assim como para vigilância de doenças infecciosas em países em desenvolvimento, sem que haja requerimento de equipamentos sofisticados (MORI; NOTOMI, 2009; PARIDA *et al.*, 2008).

Esta técnica vem emergindo como um teste promissor sendo aplicado com sucesso no diagnóstico de outras doenças causadas por protozoários, como: tripanossomíase africana, malária, giardíase, criptosporidiose, entre outros (GAO *et al.*, 2015; VERMA *et al.*, 2017). Estudos anteriores demonstraram a capacidade da LAMP em detectar infecções por *Leishmania* com alta sensibilidade e especificidade a partir de amostras de sangue. Ao longo dos últimos dez anos, diversos estudos sobre o desenvolvimento de um sistema de LAMP para o diagnóstico da LV foram publicados na literatura. Entre os principais, pode-se citar:

Takagi *et al.* (2009), Adams *et al.* (2010), Ghasemian *et al.* (2014), Verma *et al.* (2017) e Avelar; Carvalho; Rabello (2019) (Tabela 1).

Quadro 1 - Comparação entre os artigos publicados sobre desenvolvimento de um sistema de LAMP para diagnóstico da LV, no período de 2009 a 2019.

Artigos LAMP	TAKAGI <i>et al.</i>, 2009	ADAMS <i>et al.</i>, 2010	GHASEMIAN <i>et al.</i>, 2014	VERMA <i>et al.</i>, 2017	AVELAR <i>et</i> <i>al.</i>, 2019
País	Bangladesh	Sudão	Irã	Índia	Brasil
Espécie	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i>
Alvo molecular	kDNA	rRNA	kDNA	kDNA	K26
GenBank	Y11401	M80295	Z35271	Y11401	AF131228
Quantidade de primers	4	6	6	4	6
Amostra biológica	Sangue periférico	Sangue periférico	Sangue periférico	Sangue periférico e Punção da MO	Sangue periférico
Limite de detecção	1 fg	1 fg	100 fg	1 fg	1 fg
Sensibilidade	95%	94%	95%	96,9% em sangue periférico e 100% em Punção da MO	99,8%
Especificidade	100%	100%	95%	100%	99,8%

Fonte: Adams *et al.* (2010); Avelar, Carvalho e Rabello (2019); Ghasemian *et al.* (2014); Takagi *et al.* (2009); Verma *et al.* (2017).

O primeiro estudo foi desenvolvido por Takagi *et al.* (2009) que, assim como Adams *et al.* (2010) e Verma *et al.* (2017), tinha como objetivo desenvolver um sistema para identificar a espécie *L. donovani*. Essa espécie é responsável pela ocorrência da infecção na África Oriental, Bangladesh, Índia e Nepal, enquanto que na América do Sul, bacia do Mediterrâneo, China e Oriente Médio, o agente etiológico é a *L. infantum* (ROCHA *et al.*, 2018; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). Entretanto, por esta razão, esses estudos não poderiam ser reproduzidos no Brasil.

Recentemente, um estudo realizado no Brasil por Avelar, Carvalho e Rabello (2019) realizou a otimização de um sistema de LAMP para diagnóstico da LV. Diferentemente dos outros estudos, neste o alvo molecular de escolha foi o K26 (K26-LAMP). A proteína K26,

também é conhecida como *Hydrophilic acylated surface protein B* (HASP_B), é uma proteína que faz parte de uma família de moléculas de superfície pertencentes ao gênero *Leishmania*. O gene codificador do antígeno K26 tem sido utilizado como sequência alvo para tipagem molecular, a fim de caracterizar e distinguir cepas do complexo *L. donovani*. A aplicabilidade deste gene se baseia no polimorfismo genético de tamanho e de sequência dos produtos de amplificação obtidos e, esses polimorfismos variam de cepa para cepa de acordo com a localização geográfica de origem de cada uma delas (BARBOSA JÚNIOR, 2016; HARALAMBOUS *et al.*, 2008).

Recentemente, um kit de LAMP para o diagnóstico de leishmaniose, denominado Loopamp™ *Leishmania* Detection Kit foi desenvolvido em uma colaboração da Eiken Chemical Co. e da Fundação para Novos Diagnósticos Inovadores (IBARRA-MENESES *et al.*, 2018). Este kit apresenta-se em um formato pronto pra uso e baseia-se na utilização de reagentes secos inseridos em um tubo de reação, não sendo necessárias condições especiais de armazenamento. Na reação, é utilizada a *Bst* DNA polimerase e a calceína também está incluída entre os reagentes secos, para permitir a visualização a olho nu dos produtos amplificados (MUKHTAR *et al.*, 2018).

Para amplificação pelo Loopamp™ *Leishmania* Detection Kit, são utilizados *primers* direcionados para duas regiões diferentes: gene 18S rRNA e minicírculos de kDN, sendo ambos específicos para o gênero *Leishmania* (IBARRA-MENESES *et al.*, 2018). De acordo com Bezerra *et al.* (2020), o Loopamp™ apresenta o melhor sistema de *primers* disponíveis atualmente para o diagnóstico da leishmaniose. Porém, esse teste detecta todas as espécies do gênero *Leishmania* assim, não é capaz de determinar a espécie, não sendo específico para *Leishmania infantum*.

A Organização Mundial de Saúde recomenda que um teste diagnóstico ideal adequado para aplicação em países em desenvolvimento deve ser: acessível, sensível, específico, de fácil realização, rápido, robusto e não ter necessidade de equipamentos (NJIRU, 2012). O método LAMP tem capacidade e potencial de preencher completamente esses pré-requisitos, pois além de ser um método de diagnóstico rápido e de baixo custo, também utiliza amostras clínicas não invasivas ou minimamente invasivas (KHAN *et al.*, 2012).

Nesse contexto, este estudo se propôs a otimizar e aplicar esse método para diagnóstico da LV, visando a sua utilização pelos sistemas de vigilância em saúde, por ser uma técnica que requer poucos investimentos e que fornece um resultado rápido e eficaz.

3 JUSTIFICATIVA

A LV é uma infecção que, apesar de possuir diagnóstico e tratamento definidos, permanece como um problema de saúde pública. O seu diagnóstico precoce permite um melhor prognóstico ao paciente, pois quando não tratados ou tratados tardiamente, os casos têm maior letalidade. Contudo, o diagnóstico ainda é um fator limitante para o controle dessa endemia, visto que o método padrão ouro, a busca microscópica da *Leishmania*, é um procedimento invasivo, de difícil execução por requerer ambiente hospitalar e profissionais capacitados, enquanto que os métodos sorológicos existentes possuem limitações em termos de especificidade e reprodutibilidade.

Ensaio moleculares têm sido desenvolvidos para o diagnóstico da LV, como a PCR e o LAMP. No entanto, o primeiro requer equipamentos de alto custo, além de expertise técnica, o que dificulta sua implantação nos laboratórios da rede pública. O LAMP se destaca pela sua rápida execução, método simples, de baixo custo, com alta sensibilidade e fácil detecção, além de ser altamente específico.

Por existir poucos estudos ainda empregando o LAMP para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* no Brasil, o presente estudo se propôs a realizar a otimização dessa técnica promissora. Espera-se que os resultados possam dar suporte a estudos posteriores deste tema no Brasil, e futuramente subsidiar os programas de controle da LV, possibilitando que os pacientes tenham uma melhor assistência à saúde e qualidade de vida.

4 PERGUNTA CONDUTORA

A técnica de Amplificação Isotérmica em Alça (LAMP) é sensível, específica e eficaz para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral?

5 HIPÓTESE

A Amplificação Isotérmica em Alça (LAMP) é uma técnica sensível, específica e eficaz para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

Otimizar a técnica de Amplificação Isotérmica em Alça (LAMP) para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral.

6.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os aspectos analíticos (sensibilidade e especificidade) do sistema de LAMP otimizado;
- b) Comparar a performance do sistema otimizado frente ao sistema baseado em PCR convencional a partir de concentrações conhecidas de DNA de *L. infantum*;
- c) Comparar a aplicação dos sistemas de PCR convencional e de LAMP nas amostras coletadas.

7 METODOLOGIA

Na metodologia foram determinados: o desenho de estudo; a área e a população do estudo e os critérios de inclusão e exclusão. Além disso, também foram realizadas a coleta de dados e a avaliação laboratorial.

7.1 Desenho de estudo

O estudo foi experimental, sendo selecionada uma amostra não probabilística, por conveniência de indivíduos moradores de área não endêmica. O estudo se propôs a analisar parâmetros como sensibilidade e especificidade, sendo estas características do teste e não da população em que o teste está sendo aplicado.

7.2 Área de estudo

O estudo foi desenvolvido no município de Tamandaré, localizado no litoral sul do Estado de Pernambuco.

7.3 População de estudo

A população do estudo foram indivíduos residentes do município de Tamandaré provenientes de três bairros: 5 de julho, Oitizeiro e Estrela Mar. Esses indivíduos foram esclarecidos sobre a pesquisa e convidados a dela participar e a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A).

7.4 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo os indivíduos de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 18 anos e comprovadamente residentes do município de Tamandaré. Foram excluídos do estudo indivíduos com idade inferior a 18 anos e que não residissem no município em questão.

7.5 Coletas de dados

Foram coletadas amostras de sangue periférico em tubo contendo EDTA.

7.6 Avaliação laboratorial

Na avaliação laboratorial foram realizadas: a extração e purificação do DNA genômico e das amostras, PCR convencional e Amplificação Isotérmica em Alça – LAMP.

7.6.1 Extração e purificação do DNA genômico e das amostras

Para a extração e purificação de DNA genômico foi utilizada a cepa de *L. infantum* MHOM/BR/76/M4192. A extração do DNA genômico foi realizada através do protocolo de extração pelo método fenol/clorofórmio descrito por Sambrook *et al.* (1989). A extração e purificação de DNA das amostras de sangue periférico foi realizada com o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

7.6.2 PCR convencional

A PCR foi realizada de acordo com as condições descritas por Schönian *et al.* (2003), tendo como alvo o ITS-1. Os *primers* utilizados na reação foram: LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') descritos pelos autores supracitados. A análise e registros dos resultados da PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2,0% com coloração pelo brometo de etídio de acordo com Sambrook *et al.* (1989). As bandas de DNA separadas por eletroforese foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas com um sistema de documentação Polaroid MP4+ System™ (Sigma St. Louis, MA, USA).

Para definir o limite de detecção foi construída uma curva de diluição a partir de quantidades conhecidas de DNA genômico purificado de *L. infantum*. O limite de detecção do DNA genômico de *L. infantum* para o sistema ITS-1 na PCR convencional foi de 100pg (Figura 18).

Figura 18 - Limite de detecção do sistema ITS-1 PCR.



Fonte: A autora.

Legenda: M - marcador de peso molecular 100pb. 1 - 10 ng; 2 - 2 ng; 3 - 1 ng; 4 - 100 pg; 5 - 10 pg; 6 - 1 pg; 7 - 100 fg; 8 - 10 fg; 9 - 1 fg; 10 - 100 ag; C.N. - controle negativo.

Nos ensaios de especificidade, o sistema ITS-1 apresentou resultados negativos para outras espécies de tripanossomatídeos (*Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*). As espécies *Schistosoma mansoni*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Wuchereria bancrofti* também foram negativas para esse sistema.

7.6.3 Amplificação Isotérmica em Alça – LAMP

A otimização do LAMP foi realizada de acordo com as condições descritas por Ghasemian *et al.* (2014).

7.6.3.1 Desenho dos primers

Seis *primers* foram utilizados para amplificar a sequência de *L. infantum* kDNA (GenBank acesso nº Z35271) (Quadro 2).

Quadro 2 - Conjuntos de primers usados para amplificação de genes de kDNA no ensaio LAMP para *L. infantum*.

Primer	Tipo	Comprimento	Sequência (5' – 3')
FIP	<i>Forward Internal Primer</i>	38 pb	GTGGTCTGGGTAGTGGCTT-GGTT-GGATTGGCCTGAAAC
BIP	<i>Backward Internal Primer</i>	36 pb	TGCGCCTTGGACTTTCGG-TAATGTTGGGCACATGCT
F3	<i>Forward Outer Primer</i>	19 pb	TGGTTGGAAATTGGCTCTC
B3	<i>Backward Outer Primer</i>	22 pb	GATTGAGTTGGATTCATTGACG
FLP	<i>Forward Loop Primer</i>	20 pb	CTGGGTCTGGAGGCTTTATT
BLP	<i>Backward Loop Primer</i>	22 pb	GGCTTTTGTGTTGGGATTTTGTG

Fonte: Ghasemian *et al.* (2014)

7.6.3.2 Otimização das condições de amplificação

Inicialmente, a reação para o LAMP foi feita com os seguintes componentes: 40 pmol de cada *primer* FIP e BIP, 5 pmol de cada *primer* F3 e B3, 20mM Tris-HCl (pH 8.8), 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 8mM MgSO₄, 0.8M betaína (Sigma-Aldrich), 2mM de cada dNTP, 8U de *Bst* DNA Polymerase, Large Fragment (New England Biolabs) e 2µl de DNA extraído, em um volume total de 25µl. Em cada reação de amplificação foi utilizado um controle negativo.

7.6.3.3 Visualização dos resultados

Para visualização do resultado das reações de amplificação foi aplicado 1µL do reagente *SYBR Green I* ao tubo contendo o produto da reação, objetivando a alteração da cor da reação para verde em caso de resultado positivo e, laranja em caso de negativo. Durante a padronização, as reações foram monitoradas por eletroforese em gel de agarose a 2,0% do produto amplificado.

7.6.3.4 Determinação do limite de detecção

Para avaliar a sensibilidade dos sistemas de LAMP e PCR, foi construída uma curva de diluição de fator 10 a partir de uma concentração inicial de 99ng/μL do DNA genômico, que resultou nas seguintes concentrações: 5 ng/μL, 1 ng/μL, 0,5 ng/μL, 50 pg/μL, 5 pg/μL, 0,5 pg/μL, 50 fg/μL, 5 fg/μL, 0,5 fg/μL, 50 ag/μL. Para cada reação foi adicionado 2μL do DNA de *L. infantum*.

7.6.3.5 Determinação da especificidade

Para avaliar a especificidade dos métodos, os resultados obtidos foram analisados utilizando 1ng de DNA de diversos organismos pertinentes ao estudo. Para que a especificidade da reação fosse atestada, foi necessária a observação da amplificação apenas no tubo contendo o DNA de *L. infantum*.

7.7 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz Pernambuco, com CAAE 71573417.0.0000.5190 (ANEXO B). Todos os indivíduos envolvidos no estudo tomaram ciência da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (ANEXO A). A pesquisa está de acordo e a Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012, que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

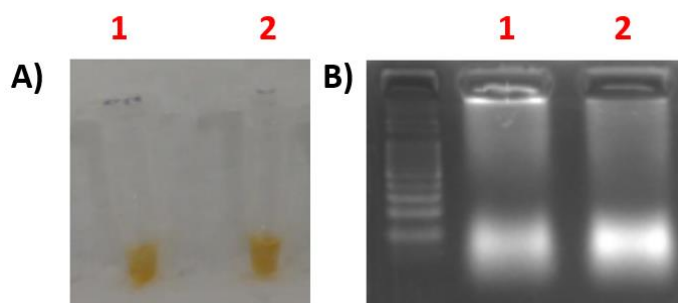
8 RESULTADOS

Para otimização do LAMP, inicialmente foram realizados ensaios com o sistema contendo os *primers de loop*.

8.1 Otimização do sistema de LAMP para diagnóstico da LV

No primeiro ensaio, foram feitos dois tubos: um para o controle positivo (CP), contendo 10ng de DNA genômico de *L. infantum*, e um para o controle negativo (CN) e, os tubos foram incubados no termociclador à 64°C, seguindo as condições descritas por Ghasemian *et al.* (2014). Para a verificação da alteração colorimétrica, foi utilizado o reagente *SYBR Green I* e todos os tubos, tanto CP quanto CN, apresentaram coloração laranja, indicando negatividade do resultado (Figura 19A). Para revelação pela eletroforese em gel de agarose, foi produzido um gel a 2% utilizando solução de Tris-borato-EDTA (TBE). Não foi possível observar o padrão de bandas característicos do LAMP, confirmando o resultado da revelação pelo *SYBR Green I* (Figura 19B).

Figura 19 - Resultados do primeiro ensaio de otimização do LAMP.

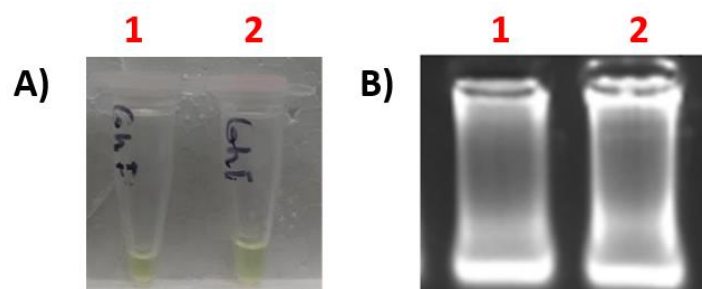


Fonte: A autora.

Legenda: 1 – CP; 2 – CN.

No segundo ensaio de otimização, foi modificada a temperatura para 65°C e os tubos foram incubados no termociclador. Na revelação pelo *SYBR Green I*, todos os tubos apresentaram coloração verde, indicando positividade tanto no CP quanto no CN (Figura 20A). Na revelação pela eletroforese, a apesar do resultado ter sido positivo, não foi possível observar o padrão de bandas característico de amostras positivas no LAMP (Figura 20B).

Figura 20 - Resultados do segundo ensaio de otimização do LAMP.

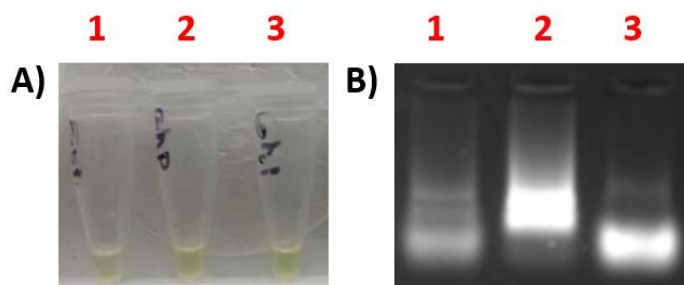


Fonte: A autora

Legenda: 1 – CP; 2 – CN.

Para o terceiro ensaio de otimização, a temperatura foi aumentada para 66°C incubando novamente no aparelho termociclador. Nesse momento, foram feitos três tubos: um CP e dois CN. Pela revelação utilizando o SYBR *Green* I, todos os tubos apresentaram coloração verde novamente, indicando positividade tanto no CP quanto no CN (Figura 21A). Na eletroforese, novamente não foi possível observar o padrão de bandas do LAMP, mesmo o resultado tendo se apresentado positivo (Figura 21B).

Figura 21 - Resultados do terceiro ensaio de otimização do LAMP.

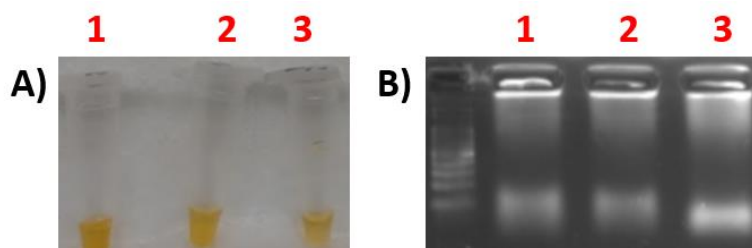


Fonte: A autora.

Legenda: 1 – CP; 2 – CN; 3 – CN.

Dando continuidade a otimização, no quarto ensaio foi modificada novamente a temperatura aumentando para 67°C e incubando os tubos no termociclador. Foram incubados três tubos: um CP e dois CN. Após adição do SYBR *Green* I, o resultado foi negativo em todos os tubos (Figura 22A). Na revelação pela eletroforese, o resultado também se mostrou negativo (Figura 22B).

Figura 22 - Resultados do quarto ensaio de otimização do LAMP.



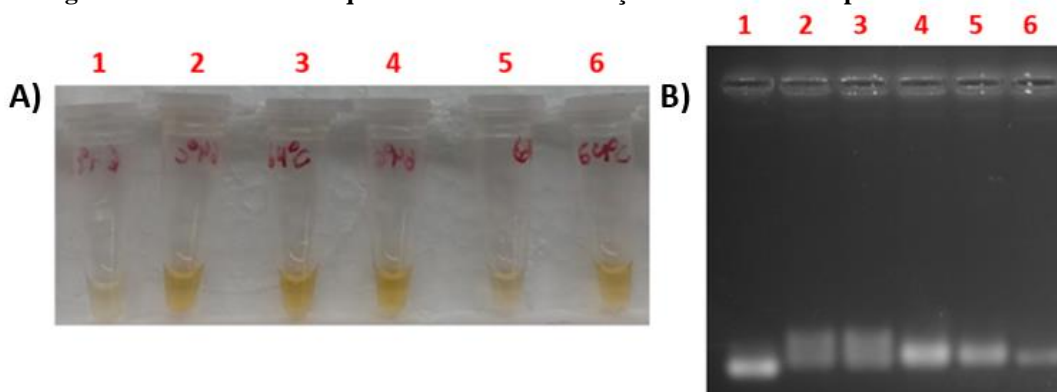
Fonte: A autora.

Legenda: 1 – CP; 2 – CN; 3 – CN.

Após avaliação dos resultados apresentados até o quarto ensaio, foram feitas algumas modificações para dar continuidade à otimização. Primeiramente, o sistema de Ghasemian *et al.* (2014) foi subdividido em: um sistema contendo os *primers* de *loop* e um outro sistema sem a adição dos *primers* de *loop*. Além disso, o equipamento thermomixer começou a ser utilizado juntamente com o termociclador, para a incubação das reações. Para a revelação pela eletroforese no gel de agarose a 2%, o tampão de corrida TBE foi substituído pelo Tris-acetato-EDTA (TAE).

No quinto ensaio de otimização foram testadas novamente as temperaturas de 64°C, 65°C e 66°C, incubando a reação tanto no termociclador quanto no thermomixer, sendo um tubo de CP e dois tubos de CN para cada temperatura. Na revelação pelo SYBR *Green* I, à temperatura de 64°C na incubação no termociclador todos os tubos, assim como no primeiro ensaio, apresentaram resultado negativo (Figura 23A). Na eletroforese, o resultado também foi negativo (Figura 23B).

Figura 23 - Resultados do quinto ensaio de otimização do LAMP à temperatura de 64°C.

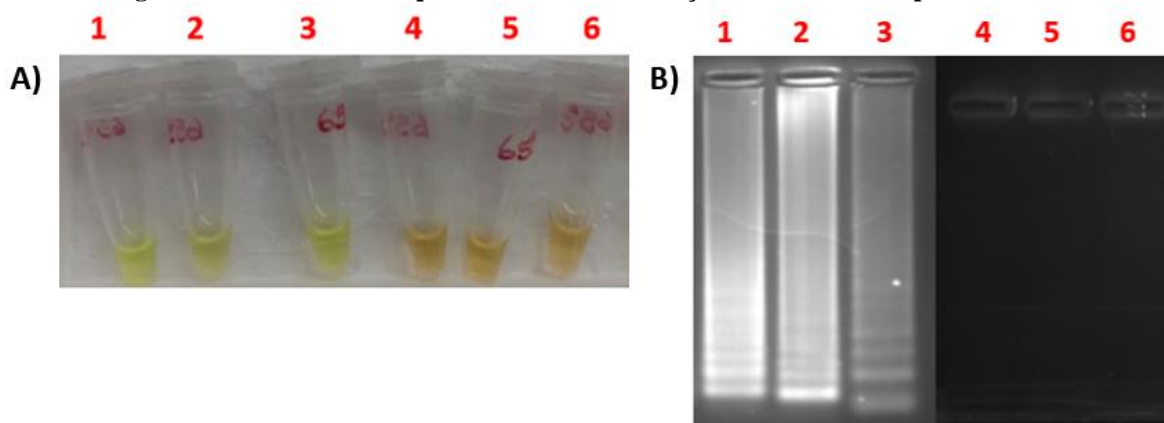


Fonte: A autora.

Legenda: 1 – CP do sistema sem *primers* de *loop*; 2 e 3 – CN do sistema sem *primers* de *loop*; 4 – CP do sistema com *primers* de *loop*; 5 e 6 – CN do sistema com *primers* de *loop*.

Para temperatura de 65°C, os tubos foram incubados no termociclador e na revelação colorimétrica todos os tubos do sistema sem os *primers* de *loop* apresentaram coloração verde e todos os tubos do sistema com os *primers* de *loop* apresentaram coloração laranja, indicando positividade e negatividade, respectivamente (Figura 24A). Na eletroforese, nos poços que correspondem os tubos do sistema sem os *primers* de *loop* é possível observar o padrão de bandas característico do LAMP, sendo a visualização mais nítida, do que nos ensaios anteriores, devido a mudança do tampão de corrida de TBE para o TAE. Enquanto que, os poços correspondentes ao do sistema com os *primers* de *loop* apresentaram-se negativos, assim como na revelação colorimétrica (Figura 24B).

Figura 24 - Resultados do quinto ensaio de otimização do LAMP à temperatura de 65°C.

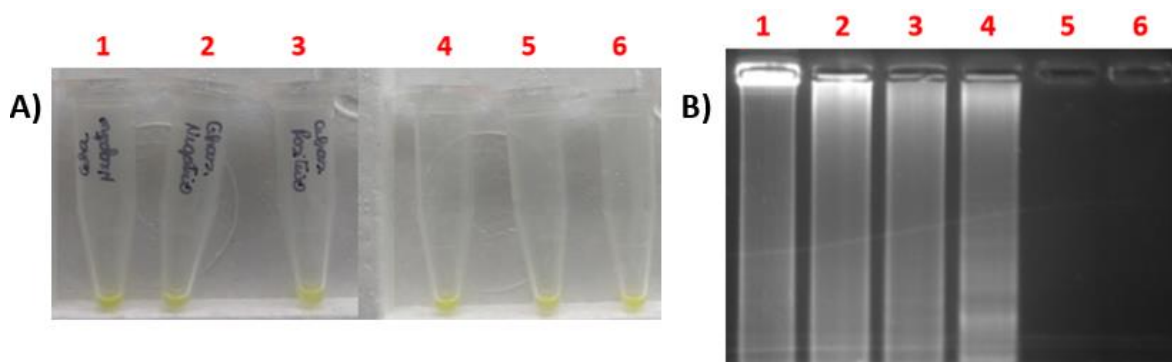


Fonte: A autora.

Legenda: 1 – CP do sistema sem *primers* de *loop*; 2 e 3 – CN do sistema sem *primers* de *loop*; 4 – CP do sistema com *primers* de *loop*; 5 e 6 – CN do sistema com *primers* de *loop*.

A última temperatura testada no quinto ensaio foi 66°C, e neste caso, os tubos foram incubados no thermomixer. Todos os tubos, de ambos os sistemas, foram positivos após adição do *SYBR Green I* (Figura 25A). Os tubos do sistema sem os *primers* de *loop* foram positivos também na eletroforese. Porém, apesar de todos os tubos do sistema com os *primers* de *loop* apresentarem positividade na revelação colorimétrica, apenas o CP apresentou positividade na corrida eletroforética (Figura 25B).

Figura 25 - Resultados do quinto ensaio de otimização do LAMP à temperatura de 66°C.

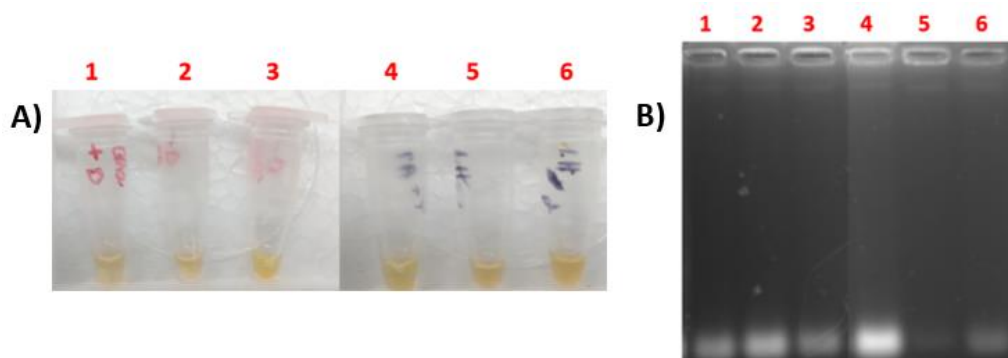


Fonte: A autora.

Legenda: 1 – CP do sistema sem *primers de loop*; 2 e 3 – CN do sistema sem *primers de loop*; 4 – CP do sistema com *primers de loop*; 5 e 6 – CN do sistema com *primers de loop*.

Para o sexto ensaio de otimização, 0.8M de betaína (4 μ l) utilizada na reação foi substituída por 2 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO), que apresenta função semelhante. Os tubos de ambos os sistemas foram incubados no termociclador novamente a 66°C (um CP e dois CN) visto que, apenas nesta temperatura os dois sistemas apresentaram positividade no ensaio anterior. Com a adição do DMSO todos os tubos, de ambos de os sistemas, foram negativos tanto na revelação colorimétrica quanto pela eletroforese (Figura 26A e 26B).

Figura 26 - Resultados do sexto ensaio de otimização do LAMP.



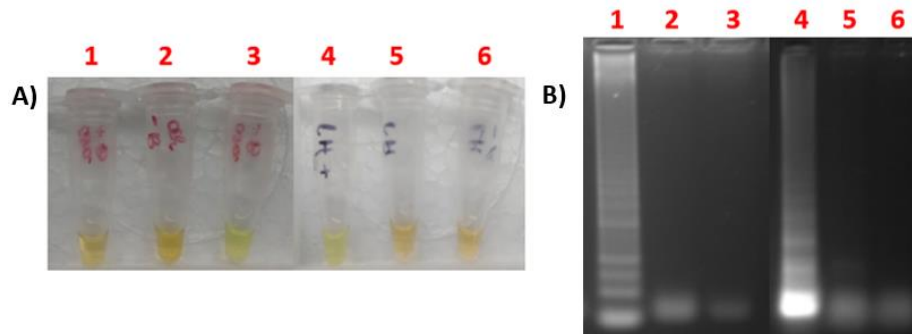
Fonte: A autora.

Legenda: 1 – CP do sistema sem *primers de loop*; 2 e 3 – CN do sistema sem *primers de loop*; 4 – CP do sistema com *primers de loop*; 5 e 6 – CN do sistema com *primers de loop*.

No sétimo ensaio de otimização, foram repetidas as mesmas condições do quinto ensaio à temperatura de 66°C, alterando a quantidade de betaína de 4 μ l para 5 μ l. Após adição do SYBR *Green I*, os CP dos dois sistemas apresentaram coloração verde, indicando positividade, e os 4 CN dos dois sistemas desenvolveram a cor laranja, indicando negatividade (Figura 27A). Na eletroforese, os sistemas se apresentaram da mesma forma

(Figura 27B). Portanto, a temperatura de 66°C com 5µl de betaína é a mais adequada para a incubação deste sistema.

Figura 27 - Resultados do sétimo ensaio de otimização do LAMP.

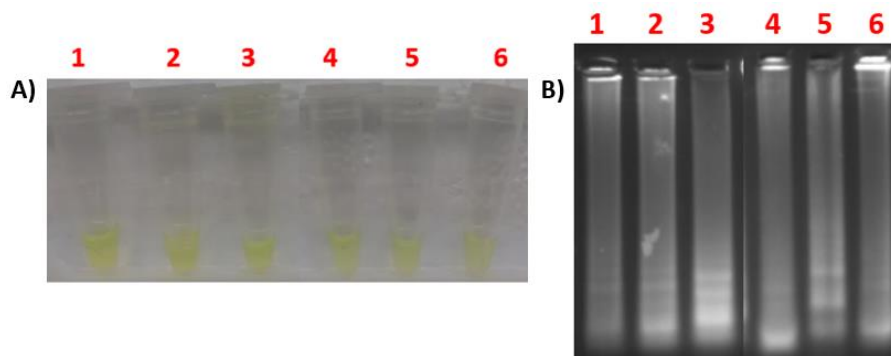


Fonte: A autora.

Legenda A: 1 e 2 – CN do sistema sem *primers* de *loop*; 3 – CP do sistema sem *primers* de *loop*; 4 – CP do sistema com *primers* de *loop*; 5 e 6 – CN do sistema com *primers* de *loop*.
Legenda B: 1 – CP do sistema sem *primers* de *loop*; 2 e 3 – CN do sistema sem *primers* de *loop*; 4 – CP do sistema com *primers* de *loop*; 5 e 6 – CN do sistema com *primers* de *loop*.

A fim de verificar se o resultado anterior se mantinha consistente, a mesma reação foi realizada seguindo exatamente as mesmas condições do sétimo ensaio, aplicando os dois sistemas. Neste caso, todos os tubos de ambos os sistemas foram positivos pelo *SYBR Green I* e pela eletroforese (Figura 28A e 28B).

Figura 28 - Resultados da otimização do LAMP.

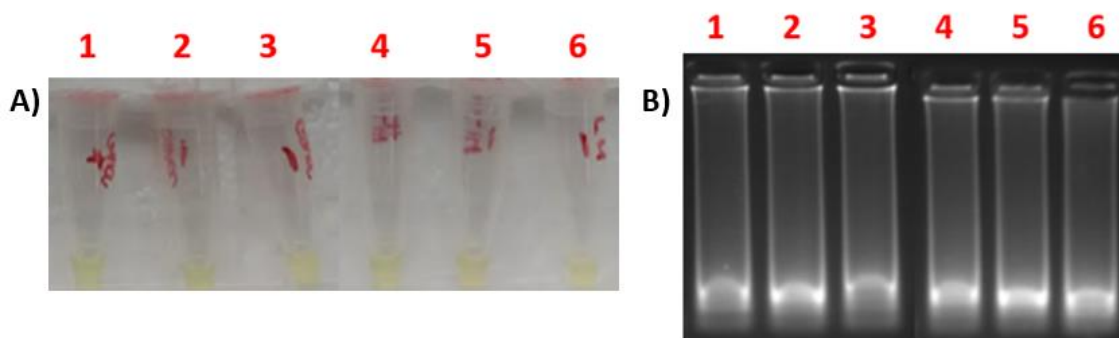


Fonte: A autora.

Legenda: 1 – CP do sistema sem *primers* de *loop*; 2 e 3 – CN do sistema sem *primers* de *loop*; 4 – CP do sistema com *primers* de *loop*; 5 e 6 – CN do sistema com *primers* de *loop*.

Para o ensaio seguinte foi realizada uma alteração na concentração do $MgSO_4$ de 8mM para 6mM, mantendo as mesmas condições anteriores. Na revelação colorimétrica e no resultado da corrida de eletroforese, todos os tubos de ambos os sistemas permaneceram positivos (Figura 29A e 29B).

Figura 29. Resultados da otimização do LAMP após alteração do MgSO₄.



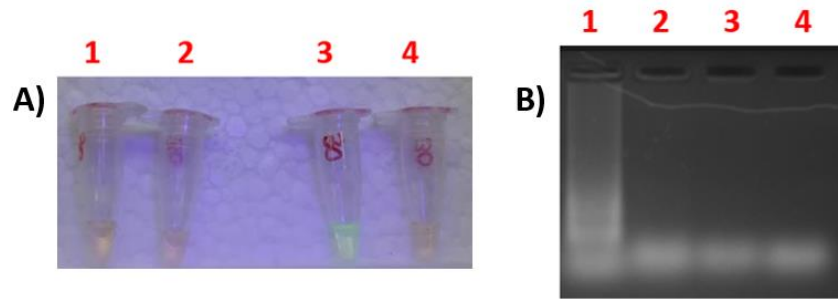
Fonte: A autora.

Legenda: 1 – CP do sistema sem *primers de loop*; 2 e 3 – CN do sistema sem *primers de loop*; 4 – CP do sistema com *primers de loop*; 5 e 6 – CN do sistema com *primers de loop*.

No ensaio seguinte, foi utilizada a enzima *Bst* 3.0 DNA polimerase e o tampão *Isothermal Amplification Buffer II*, aplicando o sistema com e sem os *primers de loop* à 66°C no termociclador. Para cada sistema foram feitos um CP e um CN para serem incubados pelo período de 30 minutos e um CP e um CN para incubação por 60 minutos. Em relação aos tubos incubados por 30 minutos, nos tubos referentes ao sistema sem os *primers de loop* ambos os CP e CN apresentaram-se na cor laranja após adição do *SYBR Green I* e revelação sob luz ultravioleta, enquanto que nos tubos do sistema com *primers de loop*, o CN revelou-se na cor laranja e o CP na cor verde, indicando a positividade do sistema (Figura 30A). Na eletroforese, os resultados apresentaram-se da mesma forma (Figura 30B). Todos os tubos que foram incubados durante 60 minutos, de ambos os sistemas, apresentaram-se positivos, tanto na revelação pelo *SYBR Green I* quanto na eletroforese (Figura 30C e 30D, respectivamente).

Nesse contexto, foi possível observar que a melhor performance do sistema ocorre com a utilização dos *primers de loop*, aplicando uma temperatura de 66°C no termociclador por um período de 30 minutos, utilizando a enzima *Bst* 3.0 DNA polimerase.

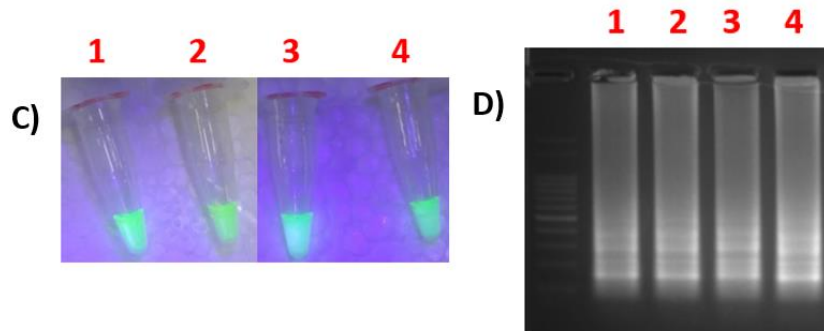
Figura 30 - Resultados da otimização do LAMP utilizando a *Bst* 3.0 DNA polimerase.



Fonte: A autora.

Legenda A: 1 – CP do sistema sem *primers* de *loop*; 2 – CN do sistema sem *primers* de *loop*; 3 – CP do sistema com *primers* de *loop*; 4 – CN do sistema com *primers* de *loop*.

Legenda B: 1 – CP do sistema com *primers* de *loop*; 2 – CN do sistema com *primers* de *loop*; 3 – CP do sistema sem *primers* de *loop*; 4 – CN do sistema sem *primers* de *loop*.

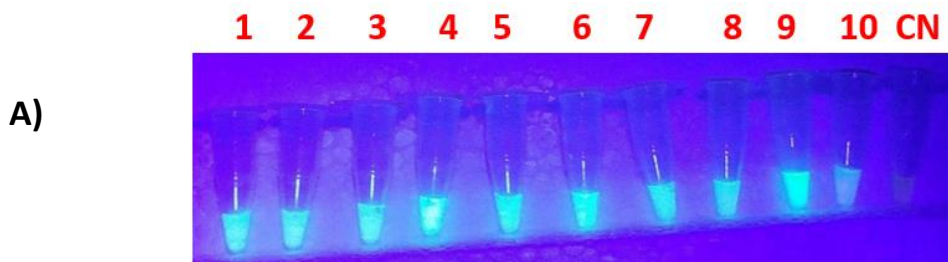


Legenda C e D: 1 – CP do sistema sem *primers* de *loop*; 2 – CN do sistema sem *primers* de *loop*; 3 – CP do sistema com *primers* de *loop*; 4 – CN do sistema com *primers* de *loop*.

8.2 Avaliação da sensibilidade do sistema LAMP

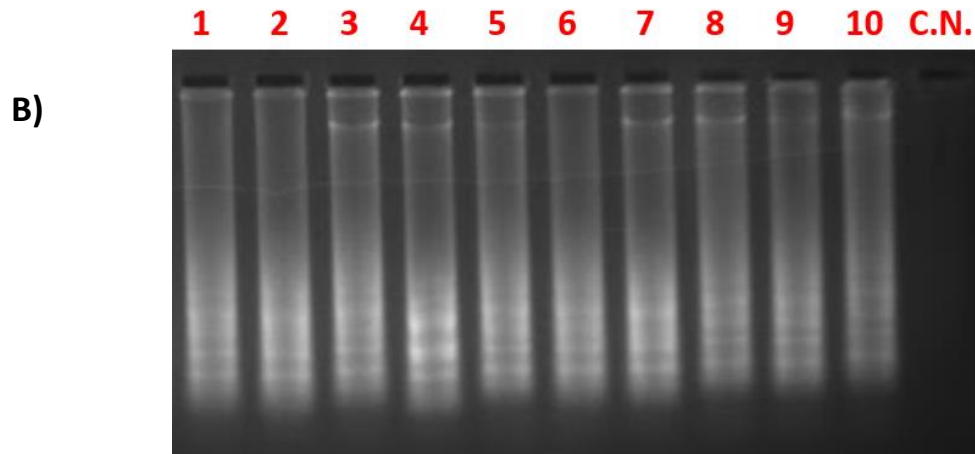
Para avaliar o limite de detecção da técnica de LAMP, o sistema foi submetido a quantidades conhecidas de DNA genômico purificado de *L. infantum*, apresentando um limite de detecção de 100 ag/ μ L (Figura 31A e 31B).

Figura 31 - Avaliação do limite de detecção da técnica de LAMP.



Fonte: A autora.

Legenda A: 1 - 10 ng; 2 - 2 ng; 3 - 1 ng; 4 - 100 pg; 5 - 10 pg; 6 - 1 pg; 7 - 100 fg; 8 - 10 fg; 9 - 1 fg; 10 - 100 ag; C.N. – controle negativo.



Legenda B: 1 - 10 ng; 2 - 2 ng; 3 - 1 ng; 4 - 100 pg; 5 - 10 pg; 6 - 1 pg; 7 - 100 fg; 8 - 10 fg; 9 - 1 fg; 10 - 100 ag; C.N. – controle negativo.

8.3 Avaliação da especificidade do sistema LAMP

Todas as espécies testadas apresentaram resultado negativo na amplificação pelo sistema de LAMP.

9 DISCUSSÃO

Para realizar o controle e diagnóstico adequado da LV, é necessário a aplicação de métodos de diagnóstico que sejam confiáveis, rápidos e também econômicos (ADAMS *et al.*, 2010). No presente estudo, foi realizada a otimização da técnica de Amplificação Isotérmica em Alça (LAMP), seguindo as condições descritas por Ghasemian *et al.* (2014) para detecção da *L. infantum* em amostras de sangue periférico. A principal vantagem em utilizar amostras de sangue total em relação ao padrão ouro de diagnóstico da LV, está no método de obtenção, que é menos invasivo.

Em seis ensaios para otimização da técnica, todos os tubos apresentaram-se com resultado positivo, tanto nos que continham o controle positivo quanto nos que representavam o controle negativo. A utilização no LAMP de quatro a seis *primers* tem o objetivo de aumentar tanto a especificidade quanto a sensibilidade da técnica. A complexidade no processo de desenho desses *primers* pode gerar complicações posteriores e, o uso de vários *primers* em uma mesma reação aumenta as chances de hidridização entre eles formando dímeros de *primers* e, conseqüentemente, gerando resultados falso-positivos (WATTS *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2018). Além disso, de acordo com Karthik *et al.* (2014), um dos principais problemas na aplicação do LAMP é o risco de contaminação nos produtos de amplificação, gerando resultados falso-positivos em controles negativos, o que dificulta a otimização da técnica.

Nos ensaios realizados, foi avaliada a sensibilidade e a especificidade do sistema LAMP. Em relação à especificidade, foi aplicado no sistema o DNA de outros tripanossomatídeos, sendo confirmada a positividade apenas para *L. infantum*. A sensibilidade foi avaliada a partir de uma curva de diluição de fator 10, onde o limite de detecção do sistema foi de 100ag de DNA.

Os estudos sobre desenvolvimento de sistemas LAMP publicados na literatura do período de 2010 a 2019 apresentam uma sensibilidade semelhante entre si, com limite de detecção equivalente 1fg (ADAMS *et al.*, 2010; AVELAR; CARVALHO; RABELLO, 2019; TAKAGI *et al.*, 2009; VERMA *et al.*, 2017). Dentre estes estudos, o de Ghasemian *et al.* (2014) foi o único que apresentou um limite de detecção menor do que todos os outros, de 100fg, sendo possível considerá-lo o sistema mais sensível. A otimização do sistema de LAMP nesta pesquisa foi realizada seguindo as condições descritas por Ghasemian *et al.* (2014), apresentando um limite de detecção 100ag, mais sensível do que o de todos os estudos relatados.

O aumento da sensibilidade pode estar relacionada ao aumento da temperatura de incubação. De acordo com Wang *et al.*, (2015) podem ser obtidos melhores resultados no LAMP a partir do aumento da temperatura de incubação pois, altas temperaturas inibem a formação de dímeros de *primers* e também promovem a hibridização correta dos *primers* ao DNA molde. A temperatura inicial aplicada neste estudo foi de 64°C, seguindo as condições de Ghasemian *et al.* (2014). Entretanto, durante a otimização, o sistema apresentou melhor desempenho quando a temperatura foi elevada para 66°C.

As técnicas baseadas em PCR são consideradas um dos principais métodos de diagnóstico da LV devido a sua alta taxa de sensibilidade e especificidade. Ao longo dos anos, diversas regiões do genoma da *Leishmania* foram estudadas para fornecer *primers* específicos e sensíveis para a diagnóstico da LV pela técnica de PCR. Entre essas regiões, pode-se citar: kDNA, rRNA e o ITS (TLAMCANI, 2016). Nesse contexto, o alvo mais utilizado é ITS, sendo largamente aplicado para diagnóstico dessa infecção, assim como também é utilizado em estudos de caracterização molecular de espécies do gênero *Leishmania* (BARBOSA JÚNIOR, 2016; SCHÖNIAN; KUHL; MAURICIO, 2011). Um estudo realizado por Fraga *et al.* (2010) no Brasil, demonstrou que a PCR convencional, utilizando amostras de sangue periférico, mostrou-se mais sensível para diagnóstico da LV do que a busca microscópica da *Leishmania* a partir de aspirados de medula óssea, apresentando uma sensibilidade de 95,6% em contraste com a sensibilidade de 80% da microscopia (FRAGA *et al.*, 2010).

Na presente pesquisa, a PCR ITS-1 foi utilizada como o método padrão ouro para diagnóstico da LV, através da detecção do DNA de *L. infantum* em amostras de sangue periférico. Nos ensaios de sensibilidade, este sistema foi capaz de detectar até 100pg de DNA em uma curva de diluição de fator 10, sendo assim, o sistema de PCR ITS-1 apresentou-se menos sensível do que o sistema de LAMP. De acordo com PARIDA *et al.* (2008), o LAMP pode ser considerado de 10 a 100 vezes mais sensível que a PCR.

Quando as amostras clínicas coletadas foram aplicadas em ambos os sistemas, todas apresentaram resultado negativo. Portanto, neste estudo, não foi possível realizar a comparação da especificidade e sensibilidade analítica entre os sistemas de PCR e LAMP.

Conforme dispostos publicados pelo Ministério da Saúde do Brasil, por a LV se tratar de uma doença que apresenta características clínicas com evolução grave, o diagnóstico precoce e eficaz é de importância fundamental para diminuição da letalidade, pois desta forma podem ser aplicadas medidas de profilaxia e tratamento adequados (BRASIL, 2006, 2014). No Brasil, todas as áreas com transmissão ou em risco de transmissão de LV devem obrigatoriamente implementar, na rotina ambulatorial, o diagnóstico, tratamento e

acompanhamento da infecção nos pacientes. Na rede básica de saúde no Brasil, o diagnóstico baseia-se principalmente em exames imunológicos e parasitológicos (BRASIL, 2010, 2016).

Por se tratar de uma doença de caráter endêmico no estado de Pernambuco, a LV está incluída entre as doenças negligenciadas consideradas prioritárias pelo Programa Sanar, instituído pela Secretaria Estadual de Saúde. Este programa tem como objetivo eliminar ou reduzir a ocorrências de infecções transmissíveis e negligenciadas, que persistem como problema de saúde pública (PERNAMBUCO, 2020). O município de Tamandaré foi considerado pelo Programa Sanar - através do Plano Integrado para Enfrentamento às Doenças Negligenciadas (2015-2018) - um dos municípios prioritários para enfrentamento da LV, por apresentar no período de 2010 a 2014 um risco de transmissão considerado alto, com ocorrência de óbitos (PERNAMBUCO, 2015).

Nesta pesquisa, foram coletadas amostras de sangue periférico de 83 indivíduos residentes do município de Tamandaré, situado no litoral sul do Estado de Pernambuco, para investigar a presença de casos de infecção por *L. infantum* na região. Pela técnica de PCR, todas as amostras apresentaram-se negativas para o diagnóstico de LV, assim como também se apresentaram negativas no diagnóstico pelo sistema de LAMP. Entretanto, apesar dos resultados negativos, não se pode afirmar que não existem casos no município pois o número amostral obtido não foi satisfatório para definir o perfil epidemiológico de LV nesta localidade.

10 CONCLUSÕES

São necessários estudos posteriores, utilizando amostras clínicas positivas para LV, a fim de definir estatisticamente a sensibilidade e especificidade analítica deste sistema para maior e melhor elucidação da aplicação desta técnica no diagnóstico da LV no país.

11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Espera-se que a otimização da técnica de LAMP para o diagnóstico da LV venha contribuir para os estudos. Para isso, é necessário que continuem sendo realizados estudos sobre o tema no Brasil, objetivando que o diagnóstico da LV seja feito de forma rápida e eficaz e, conseqüentemente, também seja realizado o tratamento precoce, proporcionando um melhor prognóstico e maior qualidade de vida aos pacientes infectados.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, I. *et al.* Optimization of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the detection of Leishmania DNA in human blood samples. **Acta Tropica**, Basel, v. 162, p.20-26, out. 2016.
- ADAMS, E. R. *et al.* Development of a Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Sensitive Detection of *Leishmania* Parasites in Clinical Samples. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 82, p. 591-596, 2010.
- AKUFFO, H. *et al.* New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 5, p. 1-16, 10 May 2018.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 5, p.1-12, 31 maio 2012.
- ALVARENGA, D. G. de *et al.* Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 2, n. 43, p. 194-197, mar./abr. 2010.
- ALVARENGA, J. S. C. *et al.* KDNA Genetic Signatures Obtained by LSSP-PCR Analysis of *Leishmania (Leishmania) infantum* Isolated from the New and the Old World. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 8, p.1-9, 17 ago. 2012.
- ANTINORI, S. *et al.* Leishmaniasis among organ transplant recipients. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 8, n. 3, p. 191-199, Mar. 2008.
- AVELAR, D. M.; CARVALHO, D. M.; RABELLO, A. Development and Clinical Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Biomed Research International**, Hindawi, v. 2019, p.1-7, 24 Jul. 2019.
- BASTIEN, P.; PROCOP, G. W.; REISCHL, U. Quantitative Real-Time PCR Is Not More Sensitive than. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 6, p.1897-1900, 9 abr. 2008.
- BARBOSA JÚNIOR, W. L. **Análise das regiões polimórficas do gene HASPB (K26) de *Leishmania infantum* em amostras clínicas positivas para leishmaniose visceral e coinfeção LV/HIV.** 2016. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.
- BEZERRA, G. S. N. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification methods for diagnosis of visceral leishmaniasis (kala-azar) – a systematic review. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, London, v. 20, n. 5, p. 455-465, 2020.
- ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (org.). **Biologia Molecular Básica.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

BOEHME, C. C. *et al.* Operational Feasibility of Using Loop-Mediated Isothermal Amplification for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Microscopy Centers of Developing Countries. **Journal Of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 6, p.1936-1940, 28 mar. 2007.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 7. ed. rev. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8. ed. rev. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2016.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose Visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Leishmaniose Visceral**. 2016. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 14 ago. 2019.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 392, p. 951-970, Sept. 2018.

CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (Estados Unidos). **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em: 20 jan. 2019.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, n. 11, p.873-882, Nov. 2007.

COSTA, C. H. N. *et al.* Competence of the Human Host as a Reservoir for *Leishmania chagasi*. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], n. 182, p. 997-1000, 2000.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. New species of protozoa of the genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi* n. previous note. **Hospital (Rio de Janeiro)**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 3-6, 1938.

- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, n. 5, p.305-318, Sept. 2004.
- DOURADO, Z. F. *et al.* Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rK39). **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 3, p. 205-214, set./dez. 2007.
- DRAGAN, A. I. *et al.* SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA. **Journal of Fluorescence**, New York, v. 22, n. 4, p.1189-1199, 26 abr. 2012.
- EZRA, N.; OCHOA, M. T.; CRAFT, N. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, [s. l.], p. 248-257, 2010.
- FANG, J. *et al.* Propidium monoazide real-time loop-mediated isothermal amplification for specific visualization of viable Salmonella in food. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 67, n. 1, p.79-88, 8 May 2018.
- FAUCHER, B.; PIARROUX, R. Actualités sur les leishmanioses viscérales. **La Revue de Médecine Interne**, Paris, v. 32, n. 9, p.544-551, set. 2011.
- FERREIRA, A. W.; MORAES, S. L. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes: correlações clínico-laboratoriais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- FLAHAULT, A.; CADILHAC, M.; THOMAS, G. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. **Journal of Clinical Epidemiology**, Oxford, v. 58, n. 8, p.859-862, ago. 2005.
- FRAGA, T. L. *et al.* Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 3, p.310-313, May 2010.
- FREIRE, M. L. *et al.* Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 13, p. 1-12, 18 Jul. 2019.
- FREITAS-JUNIOR, L. H. *et al.* Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it?. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, New York, v. 2, p.11-19, Dec. 2012.
- GAO, C. *et al.* Development of a LAMP assay for detection of Leishmania infantum infection in dogs using conjunctival swab samples. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, n. 1, p.1-8, 15 Jul. 2015.
- GHASEMIAN, M. *et al.* Development and Assessment of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis in Iran. **Iranian Journal of Parasitology**, Tehran, v. 9, n. 1, p.50-59, jan./mar. 2014.

- GILL, P.; GHAEMI, A. Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies: A Review. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, [S.I.], v. 27, n. 3, p.224-243, 8 fev. 2008.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil, quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, p. 338-349, 2004.
- GOTO, M. *et al.* Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. **Biotechniques**, Natick, v. 46, n. 3, p. 167-172, mar. 2009.
- IBARRA-MENESES, A. V. *et al.* Evaluation of fluorimetry and direct visualization to interpret results of a loopmediated isothermal amplification kit to detect *Leishmania* DNA. **Parasites & Vectors**, London, v. 250, n. 11, p. 1-9, 2018.
- LACHAUD, L. *et al.* Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington v. 40, n. 1, p. 210- 215, jan. 2002.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 811-827, 2005.
- LE FICHOUX, Y. *et al.* Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, p. 1953-1957, jun. 1999.
- LÓPEZ-VÉLEZ, R. The impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on visceral leishmaniasis in Spanish patients who are co-infected with HIV. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Liverpool, v. 97, n. 1, p. 143-147, 2 out. 2003.
- KANEKO, H. *et al.* Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. **Journal of Biochemical And Biophysical Methods**, Amsterdam, v. 70, n. 3, p.499-501, abr. 2007.
- KARTHIK, K. *et al.* New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination. **Methodsx**, [s. l.], v. 1, p.137-143, 2014.
- KHAN, M. G. M. *et al.* Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. **Parasites & Vectors**, London, v. 280, n. 5, p. 1-8, 2012.
- MACHADO, G. *et al.* Revisiting area risk classification of visceral leishmaniasis in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 19, n. 2, p.1-9, 2019.
- MAIA-ELKHOURY, A. N. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p.2941-2947, dez. 2008.
- MAURICIO, I. L. *et al.* The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, p. 188-189, 2000.

MELO, F.L. **Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em PCR para a detecção de *Schistosoma mansoni***. 2006. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

MOLINA, R. *et al.* HIV and the transmission of *Leishmania*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Liverpool, v. 97, p. 29-45, 2003.

MORI, Y.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. **Journal of Infection And Chemotherapy**, Tokyo, v. 15, n. 2, p.62-69, 2009.

MUKHTAR, M. *et al.* Sensitive and less invasive confirmatory diagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n. 12, p. 1-14, fev. 2018.

NAGAMINE, K.; HASE, T.; NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. **Molecular And Cellular Probes**, London, v. 16, n. 3, p.223-229, jun. 2002.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

NJIRU, Z. K. Loop-Mediated Isothermal Amplification Technology: Towards Point of Care Diagnostics. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 6, p.1-4, 26 jun. 2012.

NOTOMI, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 28, n. 12, p.1-7, 2000.

NZELU, C. O. *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid mass-screening of sand flies for *Leishmania* infection. **Acta Tropica**, Basel, v. 6, n. 1, p.1-6, 2014.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. **Epidemiological report of the Americas. Leishmaniases**. Washington: OPAS, 2017. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34112>. Acesso em: 20 jan. 2019.

PARIDA, M. *et al.* Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Reviews in Medical Virology**, Chichester, v. 18, n. 6, p.407-421, nov. 2008.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 14, n. 12, p.1032-1039, dez. 2010.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. **Perfil Socioeconômico, Demográfico e Epidemiológico**: Pernambuco 2016. Recife: Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, 2016. 238 p. (Normas e Manuais Técnicos).

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. **Programa Sanar – Doenças Negligenciadas**. Disponível em: <http://portal.saude.pe.gov.br/programa/secretaria-executiva-de-vigilancia-em-saude/programa-sanar-doencas-negligenciadas>. Acesso em: 16 fev. 2020.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. **Plano Integrado de Ações para o Enfretamento às Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco: SANAR – 2015 - 2018**. 2. ed. Recife: Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde, 2015. 46 p.

POLANCO, C. *et al.* Multigene Family of Ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* Reveals Contrasting Patterns of Homogenization for IGS and ITS Spacer Regions: A Possible Mechanism to Resolve This Paradox. **Genetics Society of America**, Austin, v. 149, p. 243-256, fev. 1998.

POON, L. L. M. *et al.* Sensitive and Inexpensive Molecular Test for *Falciparum* Malaria: Detecting *Plasmodium falciparum* DNA Directly from Heat-Treated Blood by Loop-Mediated Isothermal Amplification. **Clinical Chemistry**, New York, p. 303-306, 2006.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

ROCHA, A. T. F. *et al.* Visceral leishmaniasis and vulnerability conditions in an endemic urban area of Northeastern Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 112, n. 7, p.317-325, 1 jul. 2018.

ROCHA, I. C. M. *et al.* Effectiveness of the Brazilian Visceral Leishmaniasis Surveillance and Control Programme in reducing the prevalence and incidence of *Leishmania infantum* infection. **Parasites & Vectors**, London, v. 586, n. 11, p.1-12, 2018.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAPORITO, L. *et al.* Visceral leishmaniasis: host parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 17, n. 8, p. 572-576, ago. 2013.

SARKARI, B.; REZAEI, Z.; MOHEBALI, M. Immunodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Current Status and Challenges: A Review Article. **Iranian Journal of Parasitology**, Tehran, v. 13, n. 3, p.331-341, jul./set. 2018.

SCHÖNIAN, G. *et al.* Identification and determination of the relationships of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, p.19-29, jan. 1996.

SCHÖNIAN, G. *et al.* PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 47, n. 1, p.349-358, set. 2003.

SCHÖNIAN, G.; KUHLS, K.; MAURICIO, I. L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. **Parasitology**, Amsterdam, v.138, p. 405–425, 2011.

SILVA, M. A. L. **Desenvolvimento de sistemas baseados em Nested-PCR convencional e em único tubo para o diagnóstico de leishmaniose visceral**. 2012. 99 f. Tese (Doutorado

em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

SILVA, M. R. B.; STEWART, J. M.; COSTA, C. Henrique N. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene**, Baltimore, v. 72, n. 6, p.811-814, 2005.

SRIVASTAVA, P. *et al.* Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 105, n. 1, p.1-6, jan. 2011.

SRIWORARAT, C. *et al.* Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for simple detection of Leishmania infection. **Parasites & Vectors**, London, v. 591, n. 8, p.1-8, 14, nov. 2015.

STENESH, J.; ROE, B. A. DNA Polymerase from mesophilic and thermophilic bacteria: Purification and Properties of DNA Polymerase from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus stearothermophilus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, p.156-166, jan. 1972.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, n. 5, p.951-958, set. 2002.

TAKAGI, H. *et al.* Sensitive, Specific, and Rapid Detection of Leishmania donovani DNA by Loop-Mediated Isothermal Amplification. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 81, n. 4, p.578-582, 1 out. 2009.

TLAMCANI, Z. Visceral leishmaniasis: an update of laboratory diagnosis. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Hong Kong, v. 6, n. 7, p.505-508, jul. 2016.

TOMITA, N. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nature Protocols**, London, v. 3, n. 5, p.877-882, maio 2008.

TRANGONI, M. D. *et al.* LAMP technology: Rapid identification of Brucella and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 46, n. 2, p.619-626, jun. 2015.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p.229-242, nov. 2007.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p.309-322, jun. 2012.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 33, p.79-99, 2019.

VERMA, S. *et al.* Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal

leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, p.390-395, 2013.

VERMA, S. *et al.* Development of a rapid loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis and assessment of cure of Leishmania infection. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 17, n. 1, p.1-9, 23 mar. 2017.

WANG, De-Guo *et al.* Two Methods for Increased Specificity and Sensitivity in Loop-Mediated Isothermal Amplification. **Molecules**, Basel, v. 20, n. 4, p. 6048-6059, 7 abr. 2015.

WATTS, M. R. *et al.* A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Strongyloides stercoralis in Stool That Uses a Visual Detection Method with SYTO-82 Fluorescent Dye. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 90, n. 2, p.306-311, 5 fev. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Control of the leishmaniasis**: report of a meeting of the who expert committee on the control of leishmaniasis. Geneva: WHO, 2010. 949 p.

WONG, Y. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 124, n. 3, p. 626-643, 12 fev. 2018.

ZIPPER, H. *et al.* Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, n. 12, p.1-10, 7 jul. 2004.

ZHU, R. *et al.* Use of visual loop-mediated isothermal amplification of rimM sequence for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 78, n. 3, p.339-343, set. 2009.

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Mir Isidoro do Souto Jr

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Aggeu Magalhães

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Convidamos o (a) Sr(a) _____

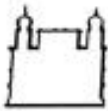
para participar do projeto de pesquisa **Validação de abordagem molecular baseada em LAMP (Amplificação Isotérmica em Alça) para o Diagnóstico da Leishmaniose Visceral** coordenado por Maria Almerice Silva, cujo objetivo é desenvolver uma nova forma de diagnóstico para a leishmaniose visceral.

Caso o Sr (a) aceite participar da pesquisa, coletaremos 10 ml (2 colheres de chá) de sangue na veia para identificar substâncias que o corpo humano produz contra o micróbio (exame de anticorpo: teste de aglutinação direta e teste rápido) e para pesquisar material genético (DNA) do micróbio da leishmaniose (reação em cadeia de polimerase - PCR). Informamos que todos os exames serão coletados com material sem micróbio, nunca usado, sendo realizados por profissionais capacitados. O exame na veia não causa nenhum desconforto além da "picada" da agulha que pode algumas vezes causar uma pequena mancha roxa (hematoma) que desaparece em alguns dias sem qualquer tratamento.

Informamos que esses exames serão importantes, pois o diagnóstico de leishmaniose visceral quando feito cedo, contribui para que o seu tratamento seja realizado de forma mais segura, com redução do tempo de internação e com recuperação mais rápida. Os resultados desses exames serão entregues ao Sr (a) e ao seu médico assistente, que deixará o resultado no seu prontuário. Na dependência do(s) resultado(s) positivo(s), o Sr. (a) será acompanhado (a) pelo médico e/ou tratado para leishmaniose na Unidade hospitalar ou PSF.

O (A) Sr (a) é livre para interromper a qualquer momento sua participação na pesquisa, sem nenhuma forma de prejuízo ao seu acompanhamento clínico e terapêutico. Solicitamos sua autorização para conservar as amostras para exame de laboratório:

- Aceito a guarda das amostras com consentimento futuro.
- Aceito a guarda das amostras sem consentimento futuro.
- Não aceito a guarda da amostra.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Aggeu Magalhães

Também solicitamos a sua autorização para coletarmos suas informações médicas para que sejam usadas em reuniões, congressos e publicações científicas não divulgando de jeito nenhum sua identidade.

Caso o Sr (a) tenha compreendido (a) e concordado (a) com todos os termos deste consentimento informado, solicitamos que assine duas vias desse documento, pois uma ficará conosco e outra com o Sr (a).

Recife, ___ de _____ de 20__

Assinatura do usuário

Endereço - Rua (usuário ou responsável)

Testemunha:

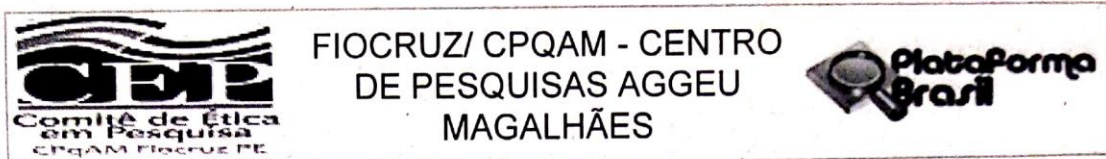
Assinatura Membro da Equipe de Pesquisa

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

Dra. Maria Almerice Lopes da Silva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n , no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 2101-2695.

Esse projeto antes de seu início foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Telefone do CEP: 21012639.

ANEXO B – PARECER DO CEP



Continuação do Parecer: 2.560.172

diagnóstico da Leishmaniose Visceral;

- Descrever o perfil clínico-laboratorial dos casos diagnosticados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos aos quais os pacientes estão expostos será o de incômodo durante a coleta venosa, devido a punção, e algum constrangimento no momento da abordagem para investigação da doença. Porém, para minimizá-los, toda equipe será treinada visando o bem-estar do participante.

Benefícios:

Não apenas avaliaremos uma nova ferramenta de diagnóstico, como também contribuiremos na descrição do perfil epidemiológico, clínico e laboratorial dos casos ativos, identificação de domicílios com casos de LV. Com isso, esperamos contribuir cientificamente com a formação de recursos humanos e na publicação de artigos, na parte técnica desejamos que os resultados da presente proposta possam subsidiar os programas de controle de leishmaniose, pois, se trata de uma técnica simples e de baixo custo com possibilidade de implantação pelo SUS nos municípios afetados pelo LV. Sendo assim, a qualidade do atendimento aos pacientes será mais rápida melhorando o tratamento e a qualidade de vida.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa considerada relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os documentos e demais declarações exigidas pelo sistema CEP/CONEP.

Recomendações:

Deverá apresentar cronograma ajustado na ocasião da entrega do relatório parcial.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O referido projeto, nesta versão, apresenta todas as informações necessárias para compreensão do estudo, da mesma forma apresenta as documentações e declarações exigidas pelo sistema CEP/CONEP em atendimento à Res. CNS 466/12.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO
DE PESQUISAS AGGEU
MAGALHÃES



Continuação do Parecer: 2.560.172

acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	declaracao_compromisso.PDF	14/03/2018 11:19:42	Janaina Campos de Miranda	Aceito
Outros	anuencia.jpg	14/03/2018 11:19:30	Janaina Campos de Miranda	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_958840.pdf	07/07/2017 16:19:10		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcleppsus2017.docx	07/07/2017 16:18:20	Maria Almerice Lopes da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetoppsusalmerice.doc	07/07/2017 16:17:47	Maria Almerice Lopes da Silva	Aceito
Folha de Rosto	FRppsus2017.pdf	07/07/2017 15:30:47	Maria Almerice Lopes da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 23 de Março de 2018

Assinado por:

Janaina Campos de Miranda
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/n°
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br