

APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE CONVENCIONAL (CPCR) E EM TEMPO REAL (QPCR) PARA DETECÇÃO DO GENOMA *LEISHMANIA SP* EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Mariana R. Pereira¹, Fabiana S. Rocha¹, Cidiane G. Melo¹,
Camila Lafuente¹, Telcia & Magalhães¹, Rachel B. Caligiorne¹

Introdução

As leishmanioses são definidas como zoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* spp. São clinicamente divididas em leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT). No Brasil, as três principais espécies responsáveis pela leishmaniose tegumentar são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) amazonensis* e *L. (Leishmania) guyanensis*. A LV é causada pela *Leishmania donovani*, na Ásia e na África, *L. infantum*, no Mediterrâneo, na China e no norte da África, e *L. chagasi*, no Brasil e no restante da América Latina. As diferentes formas de leishmaniose ocorrem endemicamente em cerca de 90 países, distribuídos em cinco continentes: África, Ásia, Europa, Américas do Sul e Norte. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que ocorram anualmente 2 milhões de novos casos, e que aproximadamente, 350 milhões de pessoas vivam em área de risco de transmissão (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/>). Estima-se ainda que cerca de 12 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas com alguma forma de leishmaniose. No Brasil, a leishmaniose visceral vem acometendo crescente número de pessoas, sendo a Região Metropolitana de Belo Horizonte considerada uma das regiões endêmicas para

essa doença. O diagnóstico laboratorial da leishmaniose consiste fundamentalmente em quatro grupos de exames: i) exames parasitológicos; ii) testes imunológicos; iii) diagnóstico molecular e iv) exames complementares. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem demonstrado ser eficaz na detecção do kDNA (DNA do cinetoplasto dos parasitos) presentes em sangue periférico, fragmentos de lesões e de medula óssea, apresentando elevadas sensibilidade e especificidade. Vários autores defendem que o isolamento e a amplificação de DNA do parasita em sangue periférico e em biópsias de lesão apresentam-se como alternativas não invasivas de diagnóstico da leishmaniose. A padronização de técnicas de biologia molecular, como a amplificação de regiões genômicas espécies-específicas, através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) é de grande importância, uma vez que darão suporte ao diagnóstico da doença e na identificação de espécies de *Leishmania*. Além de ser uma técnica não invasiva, a PCR permite a detecção do DNA do parasita nos tecidos do hospedeiro – sem necessitar passar pela etapa do cultivo – de forma rápida, sensível e prática. A sensibilidade desses ensaios em pacientes imunocompetentes variou de 72%-90% com especificidade de

¹ Laboratório de Micologia,
Núcleo de Pós-Graduação e
Pesquisa, Santa Casa de Belo
Horizonte, Brasil.

rachelbc@santacasabh.org.br

100%. Alguns autores aplicaram a PCR para a detecção da infecção em cães assintomáticos de áreas endêmicas para LV. Eles observaram 80% de positividade por PCR em cães considerados negativos, segundo os testes convencionais ELISA e RIFI. A PCR é a técnica que consegue detectar o menor número de leishmanias circulantes no sangue em relação a outros exames. Há várias técnicas incluídas nos métodos moleculares para amplificação da *Leishmania* sp, como a PCR convencional, a “Nested-PCR”, e a PCR em Tempo Real (qPCR). É importante ressaltar que tais técnicas são suplementares aos demais exames de diagnóstico e são empregadas quando surgem dúvidas na clínica, na histologia ou na sorologia. Neste estudo, foram comparados os resultados das técnicas de PCR Convencional (cPCR) e PCR em Tempo Real (qPCR) e a aplicação dessas técnicas no diagnóstico molecular da leishmaniose visceral, utilizando como amostra biológica o sangue periférico total dos pacientes.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi o de desenvolver uma ferramenta que possibilitasse ao paciente do Sistema Único de Saúde (SUS), atendido no Hospital Santa Casa de Belo Horizonte um diagnóstico diferencial pela biologia molecular, auxiliando o clínico na conclusão do diagnóstico da leishmaniose.

Metodologia

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Santa Casa de Belo Horizonte, com o número de protocolo: 021/2010. A região conservada

gênero-específica do DNA de cinetoplasto (kDNA), que compreende 120 pb, foi o alvo da amplificação. Para tanto, foi utilizado o par de iniciadores 150-152 em ambas as técnicas de PCR. Foram avaliadas amostras de sangue periférico de 30 pacientes, atendidos pela Clínica Médica da Santa Casa de Belo Horizonte.

Resultados

Os resultados obtidos demonstram que ambas as técnicas de PCR apresentaram a mesma capacidade de detectar o genoma da *Leishmania*, sendo que a PCR Convencional tem custo menos elevado que a PCR em Tempo Real. Entretanto, a PCR em Tempo Real apresenta a vantagem de se obter o resultado em apenas um dia, enquanto que a PCR convencional precisa de dois dias para a leitura do resultado. Em razão da grande variabilidade genética entre as espécies do gênero *Leishmania*, não é possível desenhar uma sonda universal para a padronização de uma qPCR pelo sistema *TaqMan*. Desta forma, a qPCR foi padronizada pelo sistema de *SybernGreen*.

Conclusões

Esses resultados demonstram que ambas as técnicas de PCR são importantes ferramentas e devem ser bem padronizadas para auxiliar no diagnóstico das doenças, principalmente nos casos em que a clínica e outros exames laboratoriais não conseguem fechar o diagnóstico. ■

Apoio Financeiro: Fapemig/CNPq
Bolsa de Estudo: PROBIC/Fapemig