

Desenvolvimento da CEL: equipamento de baixo-custo para reação e leitura de ensaios LAMP - Loop-mediated Isothermal Amplification.

Development of CEL: a low-cost equipment for Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) assays.

Felipe Gomes Naveca¹; Valdinete Alves do Nascimento¹; Victor Costa de Souza¹; Dana Cristina da Silva Monteiro¹; Arlesson Viana da Silva¹; Carlos Raimundo Pereira dos Santos Junior²; Thiago Daniel de Oliveira Moura²; Valtemar Fernandes Cardoso²

RESUMO

O sistema de saúde brasileiro é constituído por um conjunto de ações e serviços que prestam assistência a população por meio de estratégias que visam a promoção, proteção e recuperação da saúde. Um dos pontos de maior destaque é a prevenção, na qual incluem-se o diagnóstico e o tratamento precoce das doenças. A detecção e a identificação clássica de patógenos baseiam-se na microscopia e cultura, entretanto a baixa sensibilidade; a necessidade de profissionais capacitados e de infraestrutura adequada resultam, em alguns casos, na falha do diagnóstico e no atraso para o início do tratamento. Objetivo: desenvolver um equipamento para realização de ensaios LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) em ambientes com reduzida infraestrutura laboratorial. Resultados: Foram padronizados protocolos para cinco importantes doenças encontradas na região amazônica: tuberculose, malária, dengue e as febres mayaro e oropouche para utilização na CEL, equipamento portátil para a realização dos ensaios LAMP. O equipamento possui detecção fotométrica integrada, com capacidade de oito reações simultâneas, detectando a alteração da cor nas reações positivas. O resultado é mostrado em um display alfanumérico, de fácil leitura, mesmo para pessoas sem experiência com a técnica. Os resultados também podem ser transferidos por bluetooth para um smartphone, onde é possível, com o aplicativo próprio fazer a visualização gráfica. Conclusão: por se tratar de um equipamento de baixo-custo, desenvolvido para a aplicação em diagnóstico molecular, pode representar uma alternativa para ampliação da oferta de diagnóstico molecular nos serviços da rede básica de saúde, permitindo maior acesso da população, mesmo em áreas remotas.

¹ Instituto Leônidas e Maria Deane, Fiocruz Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil.

² Instituto SENAI de Inovação em Microeletrônica, Manaus, Amazonas, Brasil.

Palavras-Chave: diagnóstico molecular; diagnóstico diferencial; tuberculose; malária; arbovirose; Amazônia.

ABSTRACT

The Brazilian Health System consists of a set of actions and services that assist the population through strategies aimed at the promotion, protection, and health recovery. One of the highlights is prevention, which includes the diagnosis and early treatment of diseases. The detection and classical identification of pathogens are based on microscopy and culture, however the low sensitivity; the need for trained professionals and adequate infrastructure leads, in some cases, to the failure of the diagnosis and in the delay to start treatment. Objective: to develop CEL, an equipment for LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) assays for use in low-resource settings laboratories. Results: Protocols were standardized for five important diseases found in the Amazon region: tuberculosis, malaria, dengue, mayaro and oropouche fevers. The equipment has integrated photometric detection, with the capacity of eight simultaneous reactions, detecting the color change observed in the positive reactions. The results are shown in an easy-to-read alphanumeric display, even for people with no experience with the technique. The results can also be transferred by bluetooth to a smartphone with the CEL App, where it is possible to see the results in a graphical interface. Conclusion: Once CEL is a low-cost device, developed for molecular diagnostics, it can represent an alternative to the expansion of the molecular diagnosis in the services of the primary health attention, allowing higher population access, even in remote areas.

Keywords: molecular diagnosis; differential diagnosis; tuberculosis; malaria; arboviruses; Amazon.

INTRODUÇÃO

A adoção de novas tecnologias pelo SUS é uma iniciativa que deve fazer parte de uma gestão eficiente das políticas públicas de saúde, sobretudo no que diz respeito ao gerenciamento da oferta dos serviços de apoio diagnóstico, de maneira a evitar o agravamento de doenças (1). A detecção clássica de patógenos baseia-se na microscopia e cultura. No entanto, a baixa sensibilidade e as necessidades tanto de profissionais capacitados, como de infraestrutura adequada (2), pode resultar em atraso para início do tratamento. Desta forma, a definição quanto a enfermidade acometida e o tratamento escolhido são realizadas muitas vezes em função da abordagem sindrômica do paciente (3). Entretanto, o diagnóstico preciso é importante também para prevenir a seleção de microrganismos resistentes (4).

A técnica de LAMP - Loop-mediated Isothermal Amplification – é uma técnica de amplificação isotérmica de DNA (5). Aliado à atrativos, como alta sensibilidade, especificidade e rápido tempo de resposta (5,6), a LAMP possui outras vantagens que a tornam ainda mais atrativa para aplicação no SUS (7). Destaca-se o fato de não se fazer necessária a utilização equipamentos de custo elevado, como em outros procedimentos cobertos pelo SUS. O desenvolvimento do protótipo de um equipamento portátil para a reação de LAMP, pode permitir um maior acesso da população aos serviços diagnósticos que utilizam modernas tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, corroborando à diretriz sobre o acesso universal aos serviços de qualidade no SUS.

2) Material e Métodos

2.1) Padronização de ensaios da LAMP

Trabalhamos com cinco agravos importantes na região Amazônica (Tuberculose, Malária, Dengue e os arbovírus Mayaro e Oropouche). Foram avaliadas diferentes condições de temperatura, tempo da reação e concentrações dos reagentes: Mg²⁺, betaína, iniciadores e enzima, conforme recomendado na literatura sobre a técnica de LAMP (8,9). Todas as reações de otimização foram avaliadas em triplicata, com controles positivos, além de amostras em que não foi colocado DNA, sendo essas as reações denominadas “branco”.

2.3) Avaliação de sensibilidade e especificidade

Após a padronização das condições dos ensaios foram realizadas as avaliações de sensibilidade, comparando à outras técnicas como a PCR em tempo real (10,11). Quanto a especificidade, avaliamos o ensaio incluindo o material genético de uma série de outros agravos encontrados na região amazônica, bem como DNA humano.

2.4) Desenvolvimento da CEL (Câmara de Ensaios LAMP), protótipo de equipamento para realização e detecção da reação de LAMP.

Foi desenvolvido o protótipo de um equipamento para reação de LAMP denominado de Câmara de Ensaios LAMP ou CEL. A CEL é um dispositivo portátil, de baixo custo de fabricação, com capacidade de realizar 8 reações simultaneamente e que ao final das mesmas, detecta a alteração de cor das reações positivas. Este resultado é mostrado em um display alfanumérico, de fácil leitura, mesmo para pessoas sem experiência na técnica. O equipamento conta ainda com interface Bluetooth para o envio e registro das informações para um smartphone. O propósito do desenvolvimento do equipamento foi tornar a metodologia mais acessível; possível de ser realizada em qualquer laboratório, ou mesmo no campo. O detalhamento da construção da CEL encontra-se estudo de viabilidade patentária.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os agentes etiológicos causadores da dengue, tuberculose e malária, utilizou-se conjuntos de iniciadores previamente publicados (12-14), que foram otimizados conforme descrito no material

e métodos. Para os vírus Mayaro e Oropouche foram otimizados ensaios que nossa equipe havia desenvolvido previamente e que se encontram sob estudo de proteção intelectual, tal como os detalhes de construção do equipamento.

Apesar de estarmos utilizando iniciadores previamente publicados para os alvos DENV, malária e tuberculose, essa etapa de padronização foi necessária, pois um diferencial do nosso protocolo foi a implementação da detecção visual (colorimétrica) por meio da utilização do reagente Hydroxy Naphthol Blue (HNB), conforme proposto anteriormente (15).

As melhores condições para o ensaio tendo o vírus Dengue como alvo foram: temperatura de 65°C por 1 hora; 8mM MgSO₄ e HNB a 120µM. O protocolo funcionou para os 4 sorotipos. Fizemos também ensaios outros arbovírus (Chikungunya, Zika, Mayaro e Oropouche) e não foi observada reação cruzada.

As melhores condições da técnica de LAMP para o gene alvo mpb64 do Mycobacterium tuberculosis foram otimizadas com a cepa de referência H37Rv. Otimizamos o protocolo com 8mM de MgSO₄, 120µM de HNB mantendo a reação incubada por 60 min a 65° C. A especificidade foi avaliada frente a outras micobactérias: M. abscessus; M. haemophilum e M. gordonae, com sucesso.

A detecção do agente etiológico da malária foi otimizada com uma amostra de DAN do Plasmodium vivax, principal agente etiológico da malária no Brasil (16). As melhores concentrações de reagente permaneceram as mesmas nos dois protocolos.

Considerando a situação epidemiológica atual do Brasil, com a entrada de outros arbovírus e a necessidade de diagnóstico diferencial da dengue, desenvolvemos ensaios para os vírus Mayaro e Oropouche. Avaliamos o protocolo em um único passo (RT-LAMP), com o ensaio sendo realizado a partir do RNA viral com sucesso em concentrações idênticas ao utilizado para Dengue. Em todos os ensaios observamos uma alta sensibilidade, no entanto, ligeiramente menor que os protocolos de referência que utilizam PCR em tempo real (10,11).

COLABORADORES

Desenvolvimento do conceito e coordenação do projeto: FGN

Experimentos de prova do conceito e detecção colorimétrica: FGN, VAN e VCS

Otimização dos ensaios para os alvos: DCSM e AVS

Desenvolvimento do protótipo do equipamento: CRP, TDOM e VFC.

Escrita do Manuscrito: FGN

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos aos financiadores: CHAMADA PÚBLICA FAPEAM/DECIT-MS/CNPq/SUSAM Nº 002/2012 – PPSUS-AM PPSUS – PROGRAMA PESQUISA PARA O SUS: Gestão Compartilhada em Saúde chamada 001/2013 – PPSUS / 062.00751/2013). Agradecemos ao Dr Mauricio Morishi Ogusku do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e a Dra Claudia Maria Ríos Velásquez pelo material genético das cepas de micobactérias e plasmódio, respectivamente.

REFERÊNCIAS

1. Santos NRD. Desenvolvimento do SUS, rumos estratégicos e estratégias para visualização dos rumos. *Ciência & Saúde Coletiva*. ABRASCO - Associação Brasileira de Saúde Coletiva; 2007 Apr;12(2):429–35.
2. Galluzzi L, Magnani M, Saunders N, Harms C, Bruce IJ. Current molecular techniques for the detection of microbial pathogens. *Sci Prog*. 2007;90(Pt 1):29–50.
3. Gomes Naveca F, Sabidó M, Amaral Pires de Almeida T, Araújo Veras E, Contreras Mejía MDC, Galban E, et al. Etiology of genital ulcer disease in a sexually transmitted infection reference center in Manaus, Brazilian Amazon. Tang J, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2013;8(5):e63953.
4. Woodford N, Sundsfjord A. Molecular detection of antibiotic resistance: when and where? *J Antimicrob Chemother*. 2005 Aug;56(2):259–61.
5. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. Oxford University Press; 2000 Jun 15;28(12):E63.
6. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*. 2002 Jun;16(3):223–9.
7. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother*. 2009 Apr;15(2):62–9.
8. Nie X. Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA for Detection of Potato virus Y. *Plant Disease*. The American Phytopathological Society; 2005 Jun;89(6):605–10.
9. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc*. 2008;3(5):877–82.

10. Gurukumar KR, Priyadarshini D, Patil JA, Bhagat A, Singh A, Shah PS, et al. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virol J. BioMed Central Ltd*; 2009;6(1):10.
11. Naveca FG, Nascimento VAD, Souza VC de, Nunes BTD, Rodrigues DSG, Vasconcelos PFDC. Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses. *Mem Inst Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz*; 2017 Jul;112(7):510–3.
12. Teoh B-T, Sam S-S, Tan K-K, Johari J, Danlami MB, Hooi P-S, et al. Detection of dengue viruses using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *BMC Infect Dis. BioMed Central Ltd*; 2013;13(1):387.
13. Balne PK, Barik MR, Sharma S, Basu S. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay targeting the mpb64 gene for diagnosis of intraocular tuberculosis. *J Clin Microbiol. American Society for Microbiology*; 2013 Nov;51(11):3839–40.
14. Han E-T, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, et al. Detection of four Plasmodium species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol. 2007 Aug*;45(8):2521–8.
15. Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K-I. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques. 2009 Mar*;46(3):167–72.
16. Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J. 3rd ed. BioMed Central*; 2016 May 20;15(1):284.