

IMPLANTAÇÃO DE NOVOS ALVOS MOLECULARES EM UM SERVIÇO DE REFERÊNCIA PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LEISHMANIOSES

INTRODUÇÃO

Os Serviços de Referência do Ministério da Saúde têm papel relevante nos sistemas de vigilância pois geram impactos positivos na qualidade de vida da população, como o diagnóstico molecular de doenças tropicais negligenciadas. O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico de casos humanos de leishmaniose tegumentar tem se tornado cada vez mais comum devido à alta sensibilidade dessa técnica. Um desafio importante é utilização de técnicas que possam responder a demandas de diagnóstico diferencial dos agravos. Nas leishmanioses, este diagnóstico deve incluir outras doenças granulomatosas ou aquelas que guardam aspectos clínicos e epidemiológicos comuns, como a esporotricose e a piodermite. Esse trabalho tem por objetivo implantar novos alvos moleculares que permitam a detecção de casos relacionados com diagnóstico diferencial da leishmanioses.

METODOLOGIA

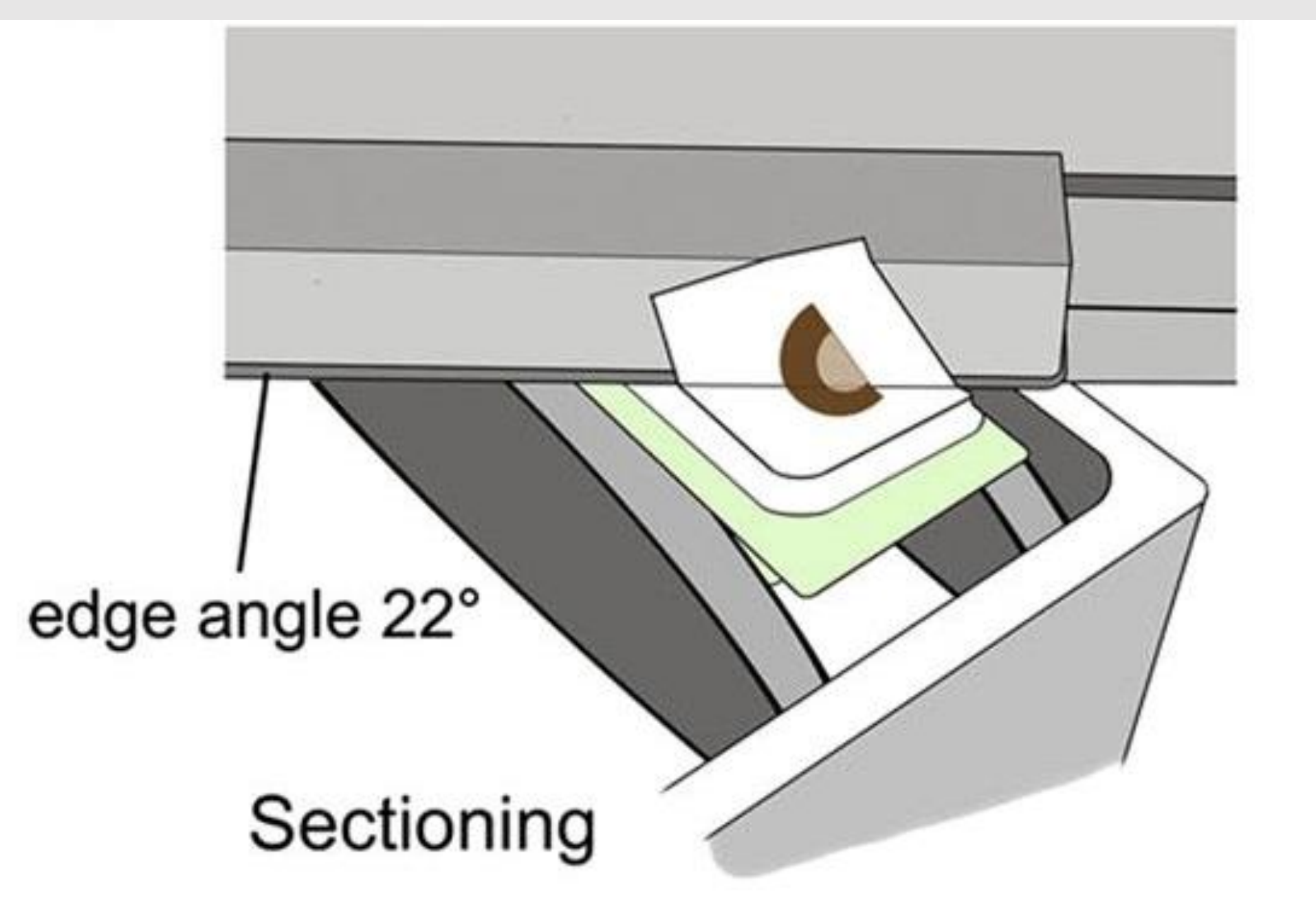
Blocos Parafinizados de Amostras de Biopsia de Pele

kDNA <i>Leishmania</i> ⁺	05 casos
kDNA <i>Leishmania</i>	08 casos
<i>Sporothrix shenkii</i>	02 casos
<i>Staphylococcus aureus</i>	01 caso
Pele Normal	01 caso

Cerca de 45 cortes parafinizados de 5 µm de cada amostra foram submetidos à extração de DNA total utilizando-se um Kit comercial (Sigma). Este kit o isolamento de DNA de tecidos emblocados em parafina, além de fungos e bactérias. Foram realizados ensaios de PCR para amplificação de sequencias de gene constitutivo. Foram ainda realizados ensaios de PCR para amplificação de sequencia do gene calmodulina em amostras clínicas de casos de esporotricose. Como controle, foram utilizados amostra de pele normal e um caso de piodermite.

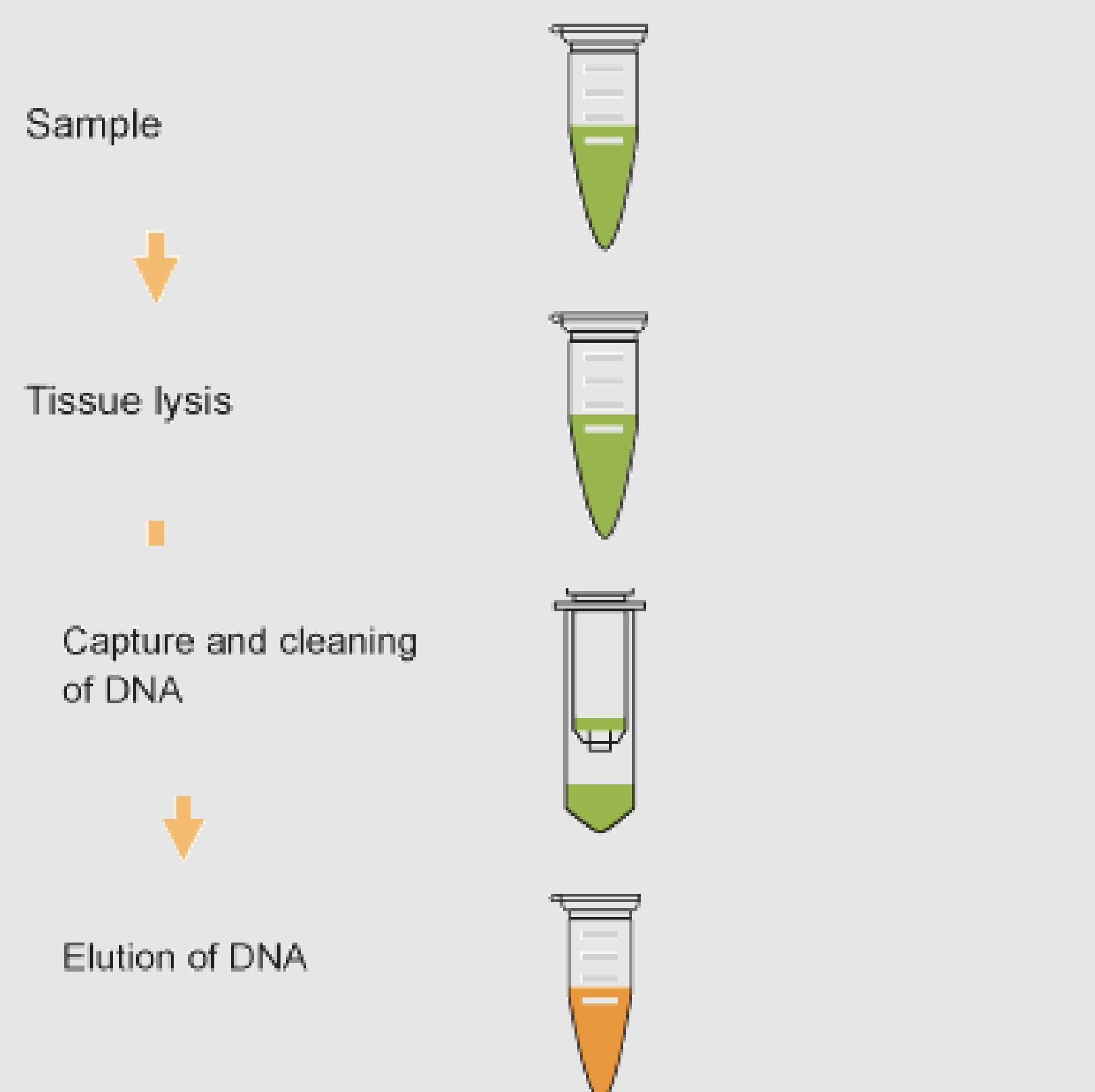
Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), sob o número CAAE 89424318.3.0000.5248

Cerca de 45 cortes parafinizados de 5 µm de espessura foram obtidos de cada amostra



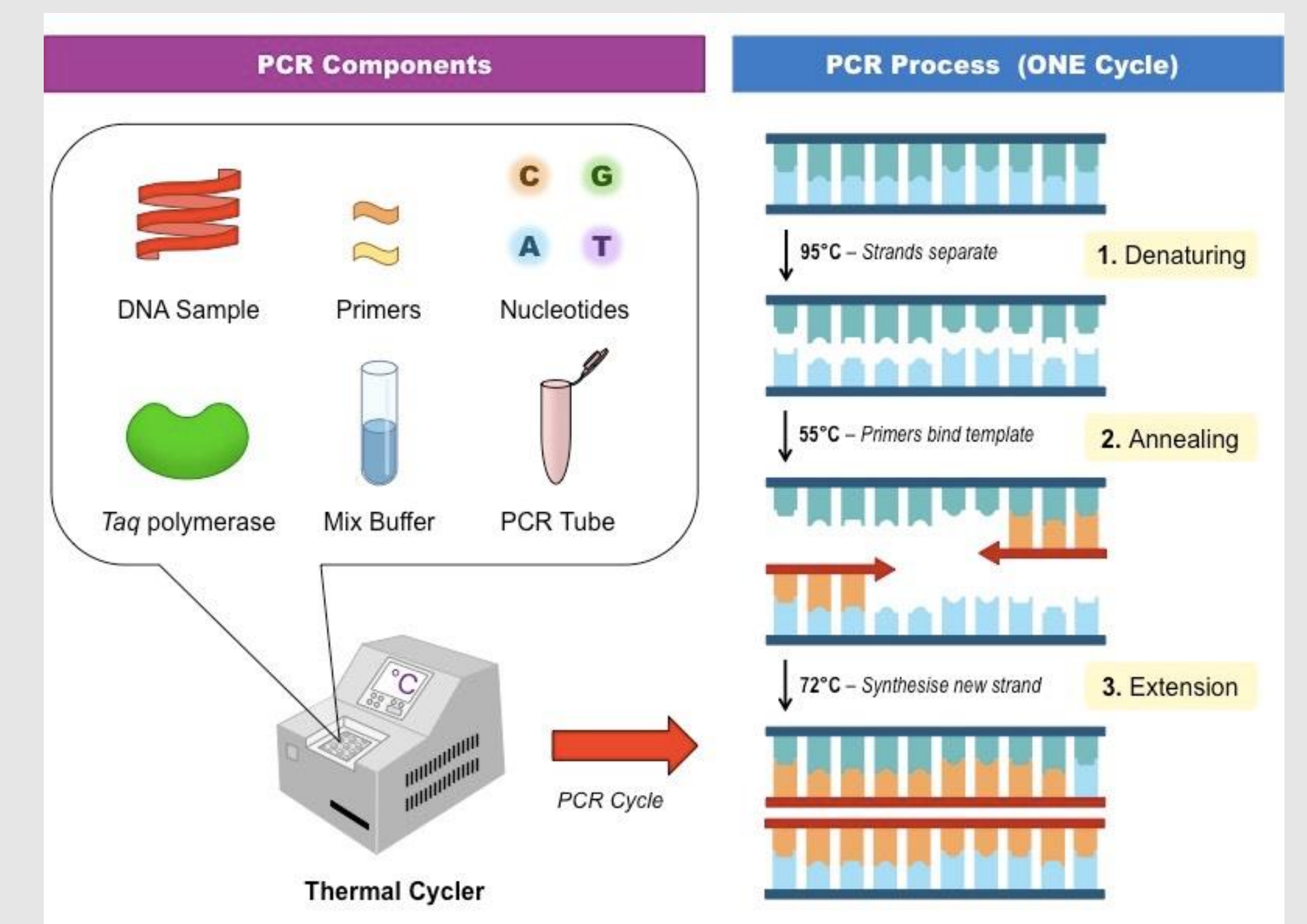
<https://www.nature.com/articles/s41598-018-25840-8>

Novo kit comercial (Sigma) para a extração de DNA das amostras de tecido



<https://www.epigentek.com/catalog/fitamp-paraffin-tissue-section-dna-isolation-kit-p-45.html>

Iniciadores utilizados nas reações de PCR:
ALVO: β globina (gene constitutivo de células eucariotas)
ALVO: gene calmodulina *S. shenkii*



<https://longroadtoinnovation.wordpress.com/2018/11/01/polymerase-chain-reaction-innovation-that-revolutionized-molecular-biology/>

RESULTADOS PRELIMINARES E CONCLUSÃO

Na primeira etapa do trabalho, avaliamos a performance do método de extração de DNA das amostras com o Kit comercial. A metodologia utilizada se mostrou adequada para amplificação do gene constitutivo β globina em todas as amostras clínicas utilizadas (Figura 1). Além disso, na padronização da PCR para amplificação do gene de calmodulina de *S. shenkii*, foi observada a amplificação do produto tanto nas amostras de isolados quanto nas amostras clínicas testadas (Figura 2). Os dados preliminares demonstram que a estratégia metodológica utilizada permitiu a identificação dos casos de esporotricose que fazem parte do diagnóstico diferencial das leishmanioses. Ensaio adicionais serão necessários para que este novo alvo possa ser utilizado na rotina do serviço de referência para o diagnóstico diferencial de leishmanioses.

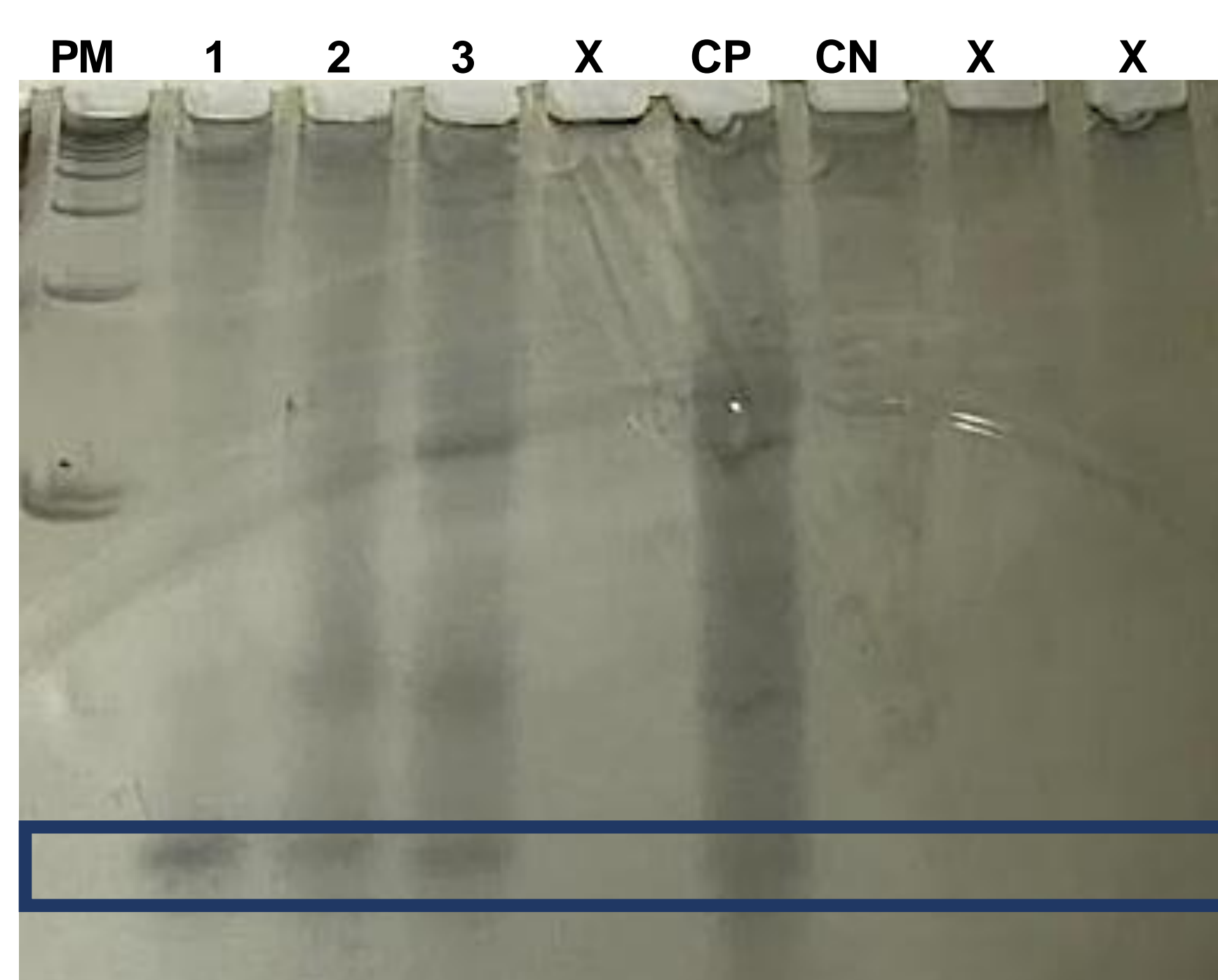


FIGURA 1: Gel de poliacrilamida mostrando os produtos de amplificação do gene constitutivo β-globina. PM (peso molecular); linhas 1-3 (amostras clínicas parafinizadas); CP (controle positivo); CN (controle negativo da reação)

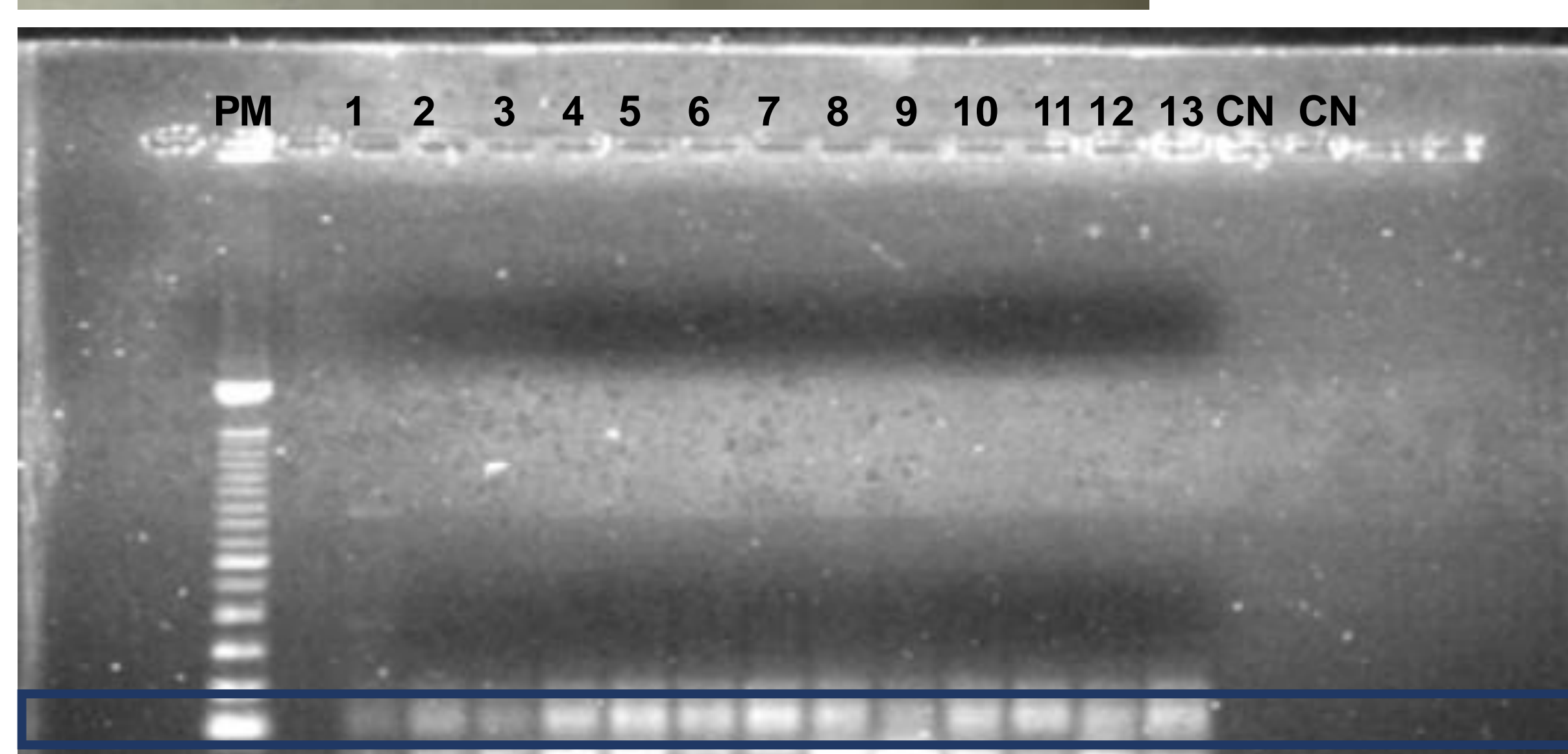


FIGURA 2: Gel de agarose 2% mostrando os produtos de amplificação do gene de calmodulina de isolados de *S.shenkii*. PM (peso molecular), Linhas 1-11 (amostras dos isolados); linhas 12-13 (amostras de clínicas parafinizadas de esporotricose), CN (controles negativos)