

# Padronização e avaliação de um ensaio de “loop-mediated isothermal amplification – LAMP” para o diagnóstico da leishmaniose visceral

Débora M. Carvalho<sup>1</sup>; Ana Rabello<sup>1</sup>; Daniel M. de Avelar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, 30.190-002, Belo Horizonte, MG, Brasil. Email: daniel.avelar@cpqrr.fiocruz.br.

Um recente avanço no diagnóstico molecular das doenças infecciosas foi o desenvolvimento da técnica “loop-mediated isothermal amplification – LAMP” que pode ser realizada em serviços de saúde com infraestrutura mais simples. Esse estudo propôs o desenvolvimento do teste kDNA/LAMP-LV e sua avaliação comparativa (com o teste já padronizado – K26/LAMP-LV) para o diagnóstico da infecção por *Leishmania infantum* em amostras de sangue periférico. Durante o desenvolvimento do teste, sequências gênicas referentes às regiões do kDNA foram utilizadas para construção de iniciadores específicos (LAMP Designer 1.10). As melhores condições para o ensaio kDNA/LAMP-LV foram otimizadas a partir de testes com diferentes concentrações de MgSO<sub>4</sub>, dNTPs, proporção de iniciadores externos e internos, temperatura de amplificação e tempo de reação. Também foram avaliados os parâmetros de sensibilidade e especificidade analíticas, repetibilidade e reprodutibilidade. Após a etapa de padronização do ensaio kDNA/LAMP-LV foi definido um protocolo para realização em aparelho de banho-maria, à 61°C (45 minutos), com interpretação visual. Os testes de sensibilidade e especificidade analíticas demonstraram, respectivamente, amplificação até a diluição de 100 fg e detecção apenas do DNA de *L. infantum* e *L. donovani*. Os testes de repetibilidade demonstraram 100% de concordância. A reprodutibilidade da interpretação visual demonstrou nível de concordância pelo teste KAPPA considerado como quase perfeita (K=1.00). Na análise preliminar comparativa entre kDNA/LAMP-LV e K26/LAMP-LV foram obtidos, respectivamente, os seguintes resultados: sensibilidade de 73,3% (11/15) e 93,3% (14/15); e especificidade de 86,6% (13/15) e 100% (15/15). Os resultados preliminares de avaliação de acurácia diagnóstica demonstram a necessidade de novos ajustes no protocolo de kDNA/LAMP-LV, enquanto que o teste K26/LAMP-LV possui potencial para tornar acessível um diagnóstico molecular, de simples realização e interpretação.

**Palavras-chave:** LAMP, diagnóstico molecular, leishmaniose visceral.

**Apoio:** FAPEMIG, CNPq, Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS-MS).