

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Detecção da bactéria *Wolbachia* em insetos através da técnica LAMP
(amplificação isotérmica mediada por *loop*)**

por

Daniela da Silva Gonçalves

Belo Horizonte

Julho / 2014

DISSERTAÇÃO MBCM – CPqRR

D.S. GONÇALVES

2014

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Detecção da bactéria *Wolbachia* em insetos através da técnica LAMP
(amplificação isotérmica mediada por *loop*)**

por

Daniela da Silva Gonçalves

Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em
Ciências na área de concentração de
Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dr. Luciano Andrade Moreira

Belo Horizonte

Julho / 2014

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

G635d Gonçalves, Daniela da Silva.
2014

Detecção da bactéria *Wolbachia* em insetos através da técnica LAMP (amplificação isotérmica mediada por *loop*) / Daniela da Silva Gonçalves. – Belo Horizonte, 2014.

XVII, 61 f: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 71 - 78

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Dengue/prevenção & controle 2. *Aedes*/citologia
3. *Wolbachia*/patogenicidade I. Título II. Moreira,
Luciano Andrade (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.918 52

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Detecção da bactéria *Wolbachia* em insetos, através da técnica LAMP
(amplificação isotérmica mediada por *loop*)**

por

Daniela da Silva Gonçalves

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:
Prof. Dr. Luciano Andrade Moreira (Presidente)
Prof. Dr. Roberta Lima Caldeira
Prof. Dr. Maurício Roberto Vianna Sant'Anna
Suplentes: Paloma Helena Fernandes Shimabukuro

Dissertação defendida e aprovada em: 18 / 07 / 2014

“Nunca deixe ninguém dizer que você não pode fazer uma coisa. Se você tem um sonho, tem que correr atrás dele.”

(Autor desconhecido)

DEDICATÓRIAS

Dedico à minha mãe (*in memoriam*), pai, irmã, todos os familiares, a todas as amizades do colégio, faculdade, especialização, mestrado, da vida e de profissão pelo incentivo, apoio, ajuda e momentos de alegria.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha mãe que, mesmo não estando mais ao meu lado, sempre me ajudou, apoiou e me fez ser quem sou. Mãe, você sempre será meu exemplo de pessoa que carrego no coração.

Ao meu pai e irmã, que mesmo não entendendo nada de biologia, estão sempre ao meu lado com muito amor, carinho, apoio, ajuda em momentos importantes da minha vida e estão sempre torcendo pelo meu sucesso.

Ao Fabio que, mesmo quando esteve distante, sempre me apoiou e esteve disposto a me ajudar, com muito amor, carinho e sempre feliz com cada uma das minhas conquistas.

Aos demais familiares por todo carinho, suporte e momentos de alegrias.

Ao Luciano, pela oportunidade, confiança, paciência, orientação, disposição para ajudar e todos os ensinamentos e conselhos que vão muito além deste trabalho. Agradeço de coração por tudo.

À “família” do Insetário, que contribuiu bastante para que tudo fosse realizado. A todos os ensinamentos, amizade e conselhos, tanto na parte profissional para realização dos experimentos e adquirir novos conhecimentos, quanto na parte pessoal, além de deixarem meus dias sempre mais felizes e com muitas risadas. Fê, Fabiano, Heverton, Etiene, Débora, Carol, Thiago, Bibs, Raíssa, Anna, Jéssica, Eric, vocês são mais que especiais!

A todo o laboratório de Malária, por todo o suporte, acolhimento e colaboração em cada experimento realizado. Especialmente à Alice pela ajuda em qualquer problema e suporte. Eu aprendi bastante com cada um de vocês.

A todas as amigas que fiz e àquelas vão muito além da parte profissional. Agradeço às companhias na hora do almoço que proporcionaram momentos de diversão e de conversas (sérias ou não) na “pauta do almoço”, especialmente à Lara (amizade firmada desde o primeiro dia), Etiene, Marina, Bianca, Débora, Ana Luiza e Gabi que estão lá quase todo dia. Cada uma se tornou muito importante para mim e espero que se mantenha por longos anos.

À Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, pelo curso e oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas e com um grande conhecimento.

A todos os colaboradores deste trabalho, Carol, Maurício, Roberta e equipe do projeto *Eliminar a Dengue – Desafio Brasil*, pelas doações e auxílio para a realização do projeto.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS ÀS INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

Agradeço às agências de fomento FAPEMIG, CNPq e Ministério da Saúde (DECIT/SVS) pelo apoio financeiro para realização deste trabalho, além da Universidade de Monash/Austrália e à Fundação Bill e Melinda Gates através do Instituto Nacional de Saúde e do programa de Controle de Transmissão através de Vetores (VCTR).

Ao CNPq, pela concessão da minha bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	XII
Lista de Tabelas	XIII
Lista de Abreviaturas e Símbolos	XIV
Resumo	XVI
Abstract	XVII
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 A bactéria <i>Wolbachia</i> e seus efeitos no hospedeiro	18
1.2 Utilização da bactéria para bloqueio de doenças no campo	22
1.3 Métodos de detecção de <i>Wolbachia</i>	24
1.4 A técnica de amplificação isotermal mediada por <i>Loop</i> – LAMP	25
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4 METODOLOGIA	37
4.1 Amostras de insetos	37
4.2 Técnicas moleculares	38
4.2.1 Extração de DNA	36
4.2.2 Padronização da Amplificação Isotermal Mediada por <i>Loop</i> (LAMP)	38
4.2.3 Avaliação da sensibilidade do LAMP	41
4.2.4 Avaliação da especificidade do LAMP.....	42
4.2.5 Utilização do HNB e SYBR Green I para visualização dos resultados	43
4.2.6 Diferença de custos PCR x LAMP	43

5 RESULTADOS	44
5.1 Padronização do LAMP	44
5.2 Sensibilidade do LAMP	47
5.3 Especificidade do LAMP	49
5.4 HNB e SYBR Green I para visualização dos resultados	50
5.5 Diferença de custos entre PCR e LAMP	52
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO	58
8 ANEXOS	59
8.1 Gonçalves DS, Cassimiro AP, de Oliveira CD, Rodrigues NB, Moreira LA. Wolbachia detection in insects through LAMP: loop mediated isothermal amplification. Parasites & Vectors, 2014 May 19; 7: 228. doi: 10.1186/1756-3305-7-228. PubMed PMID: 24885509; PubMed Central PMCID: PMC4033683.....	60
8.2 Additional file 1: Standardization of the LAMP assay incubation time.....	65
8.3 Gonçalves, Daniela da Silva e Moreira, Luciano Andrade. Wolbachia: nova estratégia de combate à Dengue. Ciência Hoje, v. 52, n. 311, p. 28-30.....	66
8.4 Bulletin Entomological Research.....	70
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático do efeito da Incompatibilidade Citoplasmática (IC).....	20
Figura 2: Representação esquemática da localização dos quatro <i>primers</i> FIP, F3, BIP e B3 e as seis regiões da sequencia alvo correspondente	26
Figura 3: Etapa não cíclica do LAMP.....	27
Figura 4: Etapa cíclica do LAMP.....	28
Figura 5: Posição e amplificação utilizando os <i>primers</i> LpF e LpB.....	30
Figura 6: RT-LAMP a partir de uma fita de RNA.....	31
Figura 7: LAMP para diferenciação de sequências mutadas contendo SNP..	32
Figura 8: Representação esquemática de parte da sequência do gene 16S da <i>Wolbachia</i> e o local de anelamento de cada <i>primer</i>	40
Figura 9: Padronização do tempo de incubação para amplificação através do LAMP.....	44
Figura 10: Especificidade e reprodutibilidade do LAMP em diferentes insetos.....	46
Figura 11: Reações de LAMP com 30ng de DNA total de <i>Aedes aegypti</i> infectadas com wMel utilizando diferentes quantidades de enzima.....	47
Figura 12: Avaliação da sensibilidade da técnica utilizando as diluições.....	48
Figura 13: Reações de LAMP com as diluições seriadas e utilizando apenas 1U de enzima por reação.....	49
Figura 14: LAMP com diferentes espécies de bactérias para verificar a especificidade da técnica.....	50
Figura 15: Utilização do UNB para visualização dos resultados a olho nu.....	51
Figura 16: SYBR Green como método de visualização de resultados.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos 4 <i>primers</i> para uso no LAMP	38
Tabela 2: Sequências dos 6 <i>primers</i> para uso no LAMP	39
Tabela 3: Relação dos custos, em reais, para execução da técnica de PCR convencional.....	53
Tabela 4: Relação dos custos, em reais, para execução da técnica LAMP.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Da – Dalton

DNA – *Desoxiribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EPI – Equipamentos de proteção individual

g – grama

HNB – *Hydroxy Naphtol Blue* (azul de hidroxinaftol)

IC – Incompatibilidade citoplasmática

LAMP – *Loop mediated isothermal amplification* (amplificação isotérmica mediada por *loop*)

mg - Miligrama

mL - Mililitro

MLST – *Multilocus sequence typing*

mM – Milimolar

mm – Milímetro

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

PCR – *Polimerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

pb – Pares de base

qPCR – *Quantitative PCR* (PCR quantitativo)

RIDL – *Release of insects carrying dominant lethal gene* (liberação de insetos carregando gene letal dominante)

RNA – *Ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)

ROS – *Reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

rpm – Rotações por minuto

RT-LAMP – *Reverse transcriptase-loop mediated isothermal amplification* (amplificação isotérmica mediada por *loop* com transcriptase reversa)

SNP – *Single-nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo único)

U - Unidade

UV – Ultravioleta

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

µg - Micrograma

μL – Microlitro

μM – Micromolar

μm – Micrômetro

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

RESUMO

Wolbachia pipientis é uma bactéria intracelular que infecta cerca de 40% dos artrópodes e alguns nematódeos, causando alterações reprodutivas em seus hospedeiros. Recentemente, duas cepas de *Wolbachia* (*wMelPop* e *wMel*) foram inseridas individualmente em *Aedes aegypti* (não infectado naturalmente) e os mosquitos adultos contendo a *Wolbachia* foram menos suscetíveis a diferentes arboviroses (Dengue e Chikungunya) bem como ao *Plasmodium* sp. Atualmente, mosquitos *A. aegypti* contendo *Wolbachia* (*wMel*) estão sendo liberados a campo em diversos países, pelo Programa *Eliminate Dengue*, como possível agente de controle biológico de Dengue. Durante o processo de invasão de mosquitos contendo *Wolbachia* no campo, há a necessidade de realização de coletas e *screening* semanal de grandes quantidades de mosquitos para detecção de *Wolbachia*, via PCR quantitativo, técnica ainda bastante onerosa. Diante disto, é imprescindível o desenvolvimento de um método rápido, específico e de baixo custo para detecção de mosquitos infectados com a bactéria, para levantamento e monitoramento da disseminação da *Wolbachia* em campo. No presente trabalho, desenvolvemos com sucesso um método rápido de detecção através do LAMP (Amplificação isotérmica mediada por *loop*) que utiliza 3 pares de *primers* que se ligam em 8 regiões distintas do DNA alvo, o que torna a reação bastante específica. Em nosso caso, desenhamos iniciadores baseando-se na sequência alvo do gene 16S rRNA da bactéria. Para padronização, foram utilizados mosquitos da colônia do Insetário do Laboratório de Malária do CPqRR, infectados e não infectados por *Wolbachia*, além de insetos de campo (mosquitos e insetos de diferentes ordens) doados por colaboradores. O tempo de incubação estabelecido para a amplificação foi de 90 minutos à 63°C, sendo possível a realização da reação tanto em termociclador, como em banho seco. Para análise da sensibilidade, foi feita a diluição seriada de plasmídeo contendo a sequência alvo de 10⁹ à 10⁰ cópias, sendo possível a amplificação utilizando apenas 1 cópia do DNA. Para verificar a especificidade, foram utilizadas amostras de diferentes espécies de bactérias e em nenhuma delas ocorreu a amplificação, confirmando que o LAMP é bastante específico. Uma maneira de reduzir os custos foi através da redução da concentração da enzima *Bst* DNA polimerase por reação e, com apenas 1 unidade, a amplificação ocorreu de maneira eficiente. Para visualização dos resultados, foram utilizados dois corantes, o azul de hidroxinaftol (HNB) e SYBR Green I. Em ambos foi possível diferenciar as amostras positivas das negativas sem a necessidade de géis de agarose, sendo que, com o HNB, não há manipulação de produto amplificado pois é adicionado antes da reação, o que evita possíveis contaminações, e também é possível observar a diferença de cores a olho nu, sem o uso de luz UV. Comparando os custos, em reais, para realização da técnica de PCR e LAMP, esta apresentou um custo de 53,92% menor em relação ao PCR, o que confirma ser uma técnica de baixo custo, já que não requer equipamentos sofisticados e nem eletroforese em gel de agarose para análise dos resultados. Desenvolvemos, neste trabalho, uma técnica para detecção de *Wolbachia* bastante específica, rápida, sensível e de baixo custo a qual possibilita seu uso em larga escala para monitoramento de diversas espécies de insetos infectadas no campo.

ABSTRACT

Wolbachia pipientis is an intracellular bacterium that infects about 40% of arthropods and some nematodes, causing reproductive alterations in their hosts. Recently, two strains of *Wolbachia* (wMelPop and wMel) were individually introduced into *Aedes aegypti* (naturally uninfected) and the adult mosquitoes containing *Wolbachia* were less susceptible to different arboviruses (Dengue and Chikungunya) and *Plasmodium* sp. Currently, *A. aegypti* mosquitoes containing *Wolbachia* (wMel) are being released in the field in many countries, through the Eliminate Dengue Program, as a possible biological control agent for Dengue. During the invasion of mosquitoes containing *Wolbachia* in the field there is the need to weekly screen large numbers of mosquitoes to detect *Wolbachia* via quantitative PCR, a technique still quite costly. Due to this fact, it is essential to develop a rapid, specific and inexpensive method to detect mosquitoes infected with this bacterium, to survey and monitor the spread of *Wolbachia* in the field. In the present study we successfully developed a rapid detection method through LAMP (loop-mediated isothermal amplification) using 3 pairs of primers that bind to 8 distinct regions of the target DNA, increasing the specificity of the reaction. In our case, we designed primers based on the sequence of the *Wolbachia* 16S rRNA gene. During the optimization process we used colony mosquitoes reared at the Insectary of the Malaria Laboratory (CPqRR), either infected or uninfected with *Wolbachia*. We also used field insect samples (mosquitoes and insects belonging to different orders). The incubation time allowing amplification was set to 90 minutes at 63°C, being possible to perform the reaction either in a thermocycler or on a heat block. For sensitivity analysis, we performed serial dilutions of plasmid DNA (10^9 to 10^0 copies) containing the target sequence and the amplification was still possible by using only one copy of the plasmid DNA. To verify the specificity, samples of different bacterial species were used and in none of them the amplification occurred, confirming that the LAMP is very specific. To reduce the reaction cost we were able to reduce the amount of the *Bst* DNA polymerase down to 1 unit and we can see clearly a great amplification. To visualize the results, two dyes were used, the Hydroxy Naphtol Blue (HNB) and SYBR Green I. In both cases it was possible to differentiate positive from negative samples without the need to run agarose gels. An advantage of using the HNB is that there is no need to manipulate amplified products as this dye is added before the reaction, avoiding possible contamination, and it is also possible to see the difference in color by naked eye without the need of UV light. When comparing the costs, in Brazilian Reais, to perform PCR or LAMP, the latter had a cost 53.92% lower than the PCR, and it does not require sophisticated equipment or electrophoresis agarose gel to analyze the results. In the present study, we develop a technique for *Wolbachia* detection which is very specific, rapid, sensitive and with low cost enabling its use in large-scale monitoring of *Wolbachia* infection status of several insect species.

1 INTRODUÇÃO

1.2 A bactéria *Wolbachia* e seus efeitos no hospedeiro

A bactéria do gênero *Wolbachia* é uma α -proteobactéria gram-negativa intracelular obrigatória do grupo das *Rickettsia*, encontrada pela primeira vez nas gônadas de *Culex pipiens* por Hertig e Wolbach em 1924 (Hertig & Wolbach, 1924) e, em 1936, foi nomeada como *Wolbachia pipientis* (Hertig, 1936). *Wolbachia* possui cerca de 0,5-1,3 μ m, está presente principalmente no citoplasma de células dos órgãos reprodutivos (Hertig, 1936) e, em 1974, foi sugerido que esta bactéria possui uma relação endossimbionte com o hospedeiro (Irving-Bell, 1974).

A partir de sequências gênicas da bactéria, incluindo a sequência do gene rRNA 16S, a espécie *Wolbachia pipientis* foi subdividida em 8 diferentes supergrupos nomeados de A a H (Casiraghi et al., 2005; Lo et al., 2002). Os supergrupos A e B são encontrados especificamente em artrópodes, C e D em espécies de nematódeos, E ocorre em artrópodes da subclasse Collembola, F encontrado em artrópodes e nematódeos, G foi removido por não ter dados conclusivos e H em artrópodes da ordem Isoptera (Lo et al., 2002; Casiraghi et al., 2005; Baldo & Werren, 2007; Werren et al., 2008).

A distribuição de *Wolbachia* é estimada em cerca de 40% dos artrópodes no mundo e ela é capaz de invadir uma população de insetos rapidamente (Zug & Hammerstein, 2012). A presença desta bactéria intracelular obrigatória é observada em uma grande quantidade de invertebrados na natureza, como insetos, ácaros e isópatas (Stouthamer et al., 1999; McGraw & O'Neill, 2004), além de aracnídeos (Breeuwer & Jacobs, 1996) e nematódeos (Bandi et al., 1998). Sabe-se que *Wolbachia* infecta várias espécies de nematódeos desde meados da década de 1970, sendo apontada como uma característica no processo evolutivo dos filarídeos (Bandi et al., 2001).

Dentre as espécies de dípteros, foi observada a infecção natural por *Wolbachia* em espécies do gênero *Culex*, como *C. pipientis* e *C. quinquefasciatus* (Hertig & Wolbach, 1924; Glaser & Meola, 2010), *Aedes albopictus* e *Aedes fluviatilis*, (Moreira et al., 2009; Zouache et al., 2009) e, recentemente, foi detectada a presença de uma nova cepa em mosquitos *Anopheles gambiae*, sendo que espécies deste gênero nunca foram encontradas antes infectadas por *Wolbachia* (Baldini et al., 2014).

Há diversas cepas diferentes de *Wolbachia* encontradas naturalmente em diferentes espécies de hospedeiros, como a cepa *w*Ri que é encontrada naturalmente em *Drosophila simulans* (Hoffmann & Turelli, 1988), *w*MelCS em *Drosophila melanogaster*, e as cepas *w*AlbA e *w*AlbB, ambas presentes no *A. albopictus* (Zouache et al., 2009).

O que justifica a presença da bactéria em algumas espécies e em outras não é o fato de que, por ser obrigatoriamente intracelular, *Wolbachia* pode não sobreviver em determinadas células de tais hospedeiros. Por outro lado, há casos também de transmissão horizontal entre as espécies (Werren et al., 2008). Foi observado que *Wolbachia* consegue se manter viável por até uma semana à temperatura ambiente, após sua purificação a partir de células do hospedeiro, além de determinadas cepas possuírem a capacidade de sobreviver por curto período fora das células, fatores os quais justificam esta transmissão horizontal (Rasgon et al., 2006).

Esta bactéria é herdada por transmissão transovariana nos estágios iniciais da embriogênese ou oogênese, é capaz de manipular o sistema reprodutor do inseto hospedeiro e, assim, se espalhar rapidamente pela população através de um mecanismo chamado incompatibilidade citoplasmática (Werren et al., 1995; Zouache et al., 2009).

O fenômeno chamado de incompatibilidade citoplasmática (IC) que a bactéria *Wolbachia* causa foi descrito primeiramente por Yen & Barr em 1971 (figura 1). Durante o cruzamento, fêmeas infectadas pela *Wolbachia* geram ovos férteis quando copulam, tanto com machos infectados, quanto não infectados, transmitindo assim a infecção de *Wolbachia* aos seus descendentes (Yen & Barr, 1971). Já na IC, o cruzamento de fêmeas não infectadas com machos infectados, ou cruzamento entre indivíduos com cepas diferentes de *Wolbachia*, resultam em um bloqueio total ou parcial do número de ovos férteis

resultantes deste cruzamento, favorecendo assim a disseminação da bactéria na natureza (Yen & Barr, 1973). Este favorecimento de dispersão da bactéria se dá pelo fato de que, como a *Wolbachia* é transmitida maternalmente, e o efeito da IC não gera descendentes, o cruzamento com fêmeas infectadas se sobressai em relação ao cruzamento com mosquitos não infectados, gerando assim mais descendentes infectados no ambiente. O real mecanismo promovido pela IC ainda é desconhecido, mas sugere-se que a bactéria gera uma modificação no espermatozóide do hospedeiro, impedindo a embriogênese ao cruzar com fêmeas não infectadas e, desta forma, promove a sua propagação no ambiente (McGraw & O'Neill, 2004).

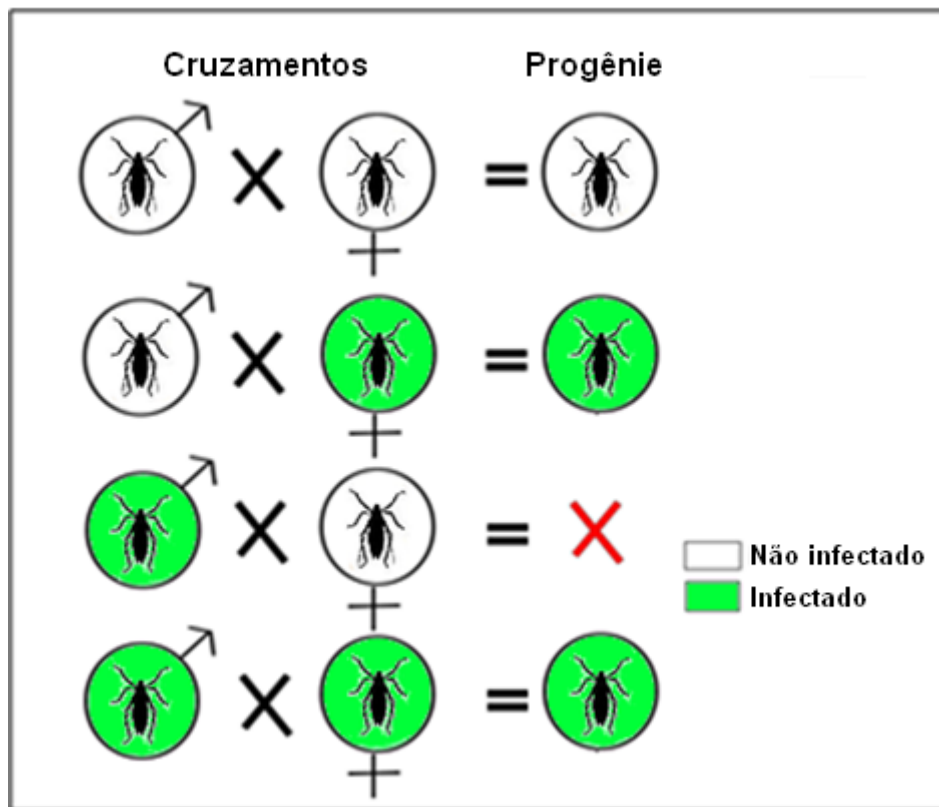


Figura 1 – Desenho esquemático do efeito da Incompatibilidade Citoplasmática (IC). Ao ocorrer o cruzamento entre macho infectado e fêmea não infectada, a IC causa um bloqueio parcial ou total na progênie.

Outras formas de manipulação que a *Wolbachia* causa no hospedeiro para que ocorra a transmissão vertical e sua disseminação é através da partenogênese, feminização ou morte dos machos, aumentando, desta forma, o número de fêmeas infectadas no ambiente (Cook et al., 2008; Teixeira et al.,

2008; Iturbe-Ormaetxe et al., 2011). Cada um destes fenômenos são cepa-específicos e ocorrem nos mais diversos hospedeiros que possuem tais cepas de *Wolbachia* (Salzberg et al., 2005; Werren et al., 2008).

A partenogênese é um fenômeno pouco comum que ocorre em algumas ordens de insetos, especificamente naquelas espécies de hospedeiros as quais os machos conseguem se desenvolver através de ovos não fertilizados (haplóides) (Werren et al., 2008). As fêmeas parentais, infectadas por *Wolbachia*, geram descendentes fêmeas através do desenvolvimento de ovos diplóides não fertilizados, ao invés de ovos haplóides que gerariam os machos (Arakaki et al., 2001; Gottlieb et al., 2002).

A feminização em machos foi descrita inicialmente em isópodes (Rousset et al., 1992) e tem sido apresentada em outros artrópodes das ordens Hemiptera, Isoptera e Lepidoptera (Werren et al., 2008). Foi observado que a *Wolbachia* invade a glândula androgênica e bloqueia a sua funcionalidade e, desta forma, os indivíduos geneticamente machos se desenvolvem como fêmeas (Vandekerckhove et al., 2003).

Outro fenótipo que a bactéria causa é de morte dos machos durante o período de embriogênese e, assim, as fêmeas terão maiores quantidades de recursos para garantir a sobrevivência e desenvolvimento (Hurst et al., 1999; Duploux et al., 2010; Werren et al., 2008).

Nas espécies que não são naturalmente infectadas por *Wolbachia*, é possível que seja feita a sua introdução artificial, estabelecimento e disseminação por todo o corpo do novo hospedeiro. Para isto, são feitas microinjeções nos ovos ou na hemolinfa do hospedeiro para obtenção de uma transfecção experimental (Jin et al., 2009; Kambris et al., 2010; McMeniman et al., 2009). No caso de microinjeção de embriões, a transfecção pode se tornar estável, enquanto na hemolinfa é transiente. Após a introdução no hospedeiro, a bactéria é capaz de colonizar diversos tecidos como glândulas salivares, túbulos de Malpighi, intestino e músculos torácicos (Dobson et al., 1999; Zouache et al., 2009).

Inicialmente, o objetivo para utilização da *Wolbachia* seria através da paratransgênese, metodologia a qual a bactéria atuaria como um vetor para expressar genes contra patógenos e, através de seus efeitos como a IC, se fixar na população de campo (Turelli & Hoffmann, 1999; Sinkins & O'Neill,

2000). Como não foi possível sua transformação genética para expressão de moléculas efetoras contra organismos causadores de doenças (Riehle & Jacobs-Lorena, 2005), através de transfecções foi observado que a bactéria consegue diminuir a capacidade vetorial de diversos artrópodes transmissores de diversas doenças (Moreira et al., 2009; Van den Hurk et al., 2012; Bian et al., 2013).

1.2 Utilização da bactéria para bloqueio de doenças no campo

As doenças transmitidas por vetores, como Malária, Dengue e Chagas, ocorrem em mais de 100 países e causam milhões de números de casos por ano em todo o mundo (McGraw & O'Neill, 2013). De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, a Malária causou, em 2012, cerca de 627.000 mortes no mundo e a Dengue causa, anualmente, cerca de 50-100 milhões de infecções (WHO, 2014).

Diversas medidas de controle são utilizadas para reduzir o elevado número de infecções e mortes destas doenças, sendo muitas delas voltadas para o combate do vetor, como uso de inseticidas e evitar reservatórios naturais do *A. aegypti* (McGraw & O'Neill, 2013). Outras metodologias, como a Técnica do Inseto Estéril (Knippling, 1955), mosquitos transgênicos (Lee et al., 2013) e a liberação de machos carregando gene letal (ou RIDL, do inglês *Release of Insects carrying Dominant Lethal gene*) (Oliveira et al., 2011) têm sido utilizadas, por exemplo, para o controle da Dengue.

Diante de algumas limitações encontradas nestas diferentes estratégias para o controle de doenças transmitidas por vetores, como a necessidade de uma constante liberação de insetos modificados, cientistas descobriram que a infecção por *Wolbachia* em mosquitos *Aedes aegypti* (naturalmente não infectado pela bactéria) reduz sua capacidade vetorial em transmitir doenças como Dengue, Chikungunya e Febre Amarela (Moreira et al., 2009; Van den Hurk et al., 2012), podendo esta ser uma ferramenta adicional para o controle de doenças no mundo.

Após a descoberta deste efeito de bloqueio conferido pela *Wolbachia* à transmissão de patógenos por vetores, como no caso do vírus da Dengue, cogitou-se que a *Wolbachia* poderia então ser utilizada em campo com o propósito de diminuir a transmissão de patógenos sem que ocorresse a eliminação da população de mosquitos no meio ambiente (Moreira et al., 2009).

O mecanismo utilizado para a bactéria interferir do desenvolvimento de patógenos dentro dos vetores ainda não está muito bem estabelecido. Algumas hipóteses indicam que a *Wolbachia* induz a produção de peptídeos antimicrobianos, a ativação da resposta imune inata e um aumento do nível de expressão de genes ligados à resposta imune e ROS (espécies reativas de oxigênio) (Moreira et al., 2009; Kambris et al., 2010; Pan et al., 2012), incluindo o aumento da melanização da hemolinfa para encapsulação de patógenos (Thomas et al., 2011).

As variadas cepas da bactéria apresentam efeitos diversos, dependendo de qual hospedeiro estão habitando. Foi observado que a cepa wMelPop altera a transcrição de um número muito maior de genes do mosquito *A. aegypti* em relação à cepa wMel, além de afetar diversas funções moleculares e biológicas do vetor (Rancès et al., 2012). Desta forma, os níveis de bloqueio induzidos pela bactéria dependem de qual cepa está sendo utilizada e se o hospedeiro é susceptível à infecção, para que a cepa escolhida o colonize (van den Hurk et al., 2012).

A cepa de *Wolbachia* denominada wMelPop, foi introduzida no *A. aegypti*, que não é naturalmente infectado pela bactéria, após milhares de microinjeções em embriões de mosquitos e foi observado que ela invade diversos tecidos, causa diminuição da longevidade, tem uma forte IC e afeta o *fitness* do mosquito (McMeniman et al., 2009; Yeap et al., 2011). A bactéria foi capaz de reduzir a capacidade do mosquito, com idade mais avançada, de inocular a probóscide no hospedeiro para realização do repasto sanguíneo, diminuindo as chances de transmissão de Dengue (Moreira et al., 2009; Turley et al., 2009). Mais tarde, com a descoberta que a bactéria pode bloquear a infecção por patógenos nos mosquitos, a diminuição da longevidade não foi mais tão importante, dando lugar para o mecanismo de bloqueio (Iturbe-Ormaetxe et al., 2011).

Dentro desse contexto, foi desenvolvida uma iniciativa global para diminuir ou até mesmo erradicar a transmissão de Dengue, o *Eliminate Dengue Program*, através da liberação de mosquitos *A. aegypti* infectados por *Wolbachia* (www.eliminatedengue.org). O programa, que envolve liberações de mosquitos infectados *com Wolbachia* em campo, vem ocorrendo na Austrália, Indonésia, Vietnã, China, Colômbia e vem, desde 2012, sendo desenvolvido no Brasil em parceria com a Fundação Oswaldo Cruz (projeto *Eliminar a Dengue – Desafio Brasil*) (Maciel-de-Freitas et al., 2012). O processo de invasão da *Wolbachia* no ambiente pode levar de 10-20 semanas de liberações semanais de mosquitos infectados, sendo necessário o monitoramento semanal para verificar o aumento da frequência de mosquitos positivos para a bactéria no campo. Ao atingir pelo menos 70% da população, a *Wolbachia* tende a se estabelecer no ambiente sem que haja a necessidade de outras liberações, sendo possível visualizar o grande poder de disseminação da bactéria, através de mecanismos naturais, nas populações de campo (Hoffmann et al., 2011).

1.3 Métodos de detecção de *Wolbachia*

Para detecção de *Wolbachia* nos mais diversos hospedeiros artrópodes, as técnicas mais comumente utilizadas baseiam-se tanto no método convencional de PCR (reação em cadeia polimerase), bem como no PCR quantitativo (*Real Time* qPCR). Em ambas as técnicas, utiliza-se como alvo o gene que codifica a proteína de superfície da bactéria, o gene *WSP* (Moreira et al., 2009), além do gene ribossomal *16S rRNA* (Simoies, et al., 2011) e o gene de divisão celular *ftsZ* (Werren et al., 1995). O nosso grupo utilizou estas técnicas para detecção de *Wolbachia* em diferentes insetos de campo (manuscrito em revisão), mas são técnicas caras e que requerem equipamentos sofisticados para sua execução.

Para que seja feita a tipagem de *Wolbachia*, foi desenvolvida a técnica de MLST (*Multilocus sequence typing*), a qual utiliza cinco genes *housekeeping* (*gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ* e *fbpA*) distribuídos ao longo do genoma da bactéria. Através desta técnica, é possível detectar marcadores cepa-específicos, o que

permite estudos de evolução, genética e diversidade da bactéria (Baldo et al., 2006). A base de dados da *Wolbachia* contendo os cinco genes *housekeeping*, além do gene *WSP* (*Wolbachia surface protein*) encontra-se disponível no site <http://pubmlst.org/wolbachia/>.

Desde a descoberta da PCR como método de diagnóstico para doenças (Saiki et al., 1992), a técnica vem sendo utilizada para detecção de diversos micro-organismos e vem sofrendo diversas modificações. Notomi e colaboradores, em 2000, desenvolveram um novo método de amplificação, em uma temperatura constante, o qual é possível obter uma quantidade de DNA amplificado em escala exponencial, sendo rápida, eficiente e altamente específica, denominada LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*) (Notomi et al., 2000).

Esta nova metodologia de amplificação utiliza a enzima *Bst* DNA polimerase, extraída de *Bacillus stearothermophilus*, com atividade de deslocamento de fita (*strand displacement activity*). Esta eficiente amplificação, em temperatura constante entre 60-65°C, pode ser obtida entre 15 a 60 minutos, sendo uma técnica mais rápida já que não há trocas de temperaturas, não há a necessidade de equipamentos sofisticados para execução e nem de eletroforese em gel de agarose para visualização dos resultados (Notomi et al., 2000; Goto et al., 2009).

1.4 A técnica de amplificação isoterma mediada por *Loop* – LAMP

Inicialmente, a técnica LAMP, criada por Notomi e colaboradores em 2000, começou a ser utilizada após aparecimento dos vírus *West Nile* e SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome* ou síndrome respiratória aguda grave) e, atualmente, tem sido aplicada para diagnósticos de diversas doenças, como Dengue, Chikungunya, *Rift Valley Fever*, Hepatite A e em infecções por *Plasmodium vivax* (Parida et al., 2004, 2005, 2007, 2008; Peyrefitte et al., 2008; Thi et al., 2004; Yoneyama et al., 2007).

Esta metodologia, que utiliza a *Bst* DNA polimerase para amplificação, foi inicialmente descrita utilizando 2 pares de *primers*, sendo um par de *primers*

internos, usualmente chamados de FIP e BIP (*forward inner primer* e *backward inner primer*), e outro par de *primers* externos F3 e B3 (*outer primers*), os quais são desenhados a partir da sequência de DNA que se deseja amplificar (figura 2), sendo específicos para seis regiões distintas desta sequência alvo (Notomi et al., 2000).

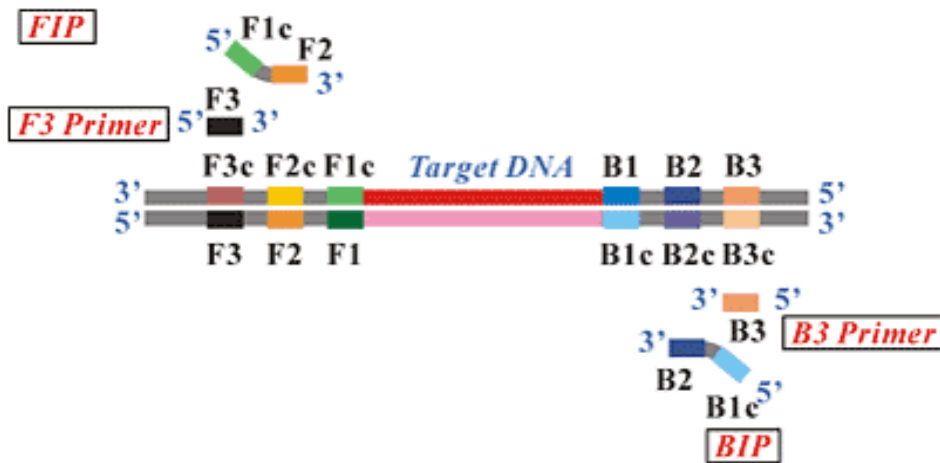


Figura 2: Representação esquemática da localização dos quatro *primers* FIP, F3, BIP e B3 e as seis regiões da sequência alvo correspondente (F1c, F2c, F3c, B1c, B2c e B3c). Fonte: Eiken Chemical Co. Ltd.

O princípio do LAMP se baseia em uma reação de deslocamento de fitas pela *Bst* DNA polimerase contendo uma etapa não cíclica e uma etapa cíclica:

Etapa não cíclica

Esta etapa se inicia com a *Bst* DNA polimerase deslocando uma das fitas do DNA de dupla fita e liberando fitas simples, sem a necessidade de altas temperaturas para desnaturação. A partir deste deslocamento, ocorre a ligação dos *primers* na fita simples de DNA, iniciando-se pela extremidade 3' da região F2 do FIP e síntese da fita na região F2c. Em seguida, o F3 se liga à região F3c e inicia a síntese de DNA novamente e ocorre o deslocamento da fita que foi formada anteriormente à partir da ligação do *primer* FIP e, nesta fita que foi

liberada, ocorre a formação do *loop* entre as regiões complementares F1c e F1. Nesta fita então ocorre a ligação do BIP e em seguida a síntese da nova fita que desfaz o *loop* formado pelo FIP, deixando-a linear. Ocorre a ligação do *primer* B3, ocorre o deslocamento da fita originada a partir de BIP e assim é formado um fragmento com *loops* em cada extremidade, o qual se assemelha a um haltere (figura 3), necessária para se iniciar a etapa cíclica da reação (Notomi et al., 2000; Ushikubo, 2004; Parida et al., 2008).

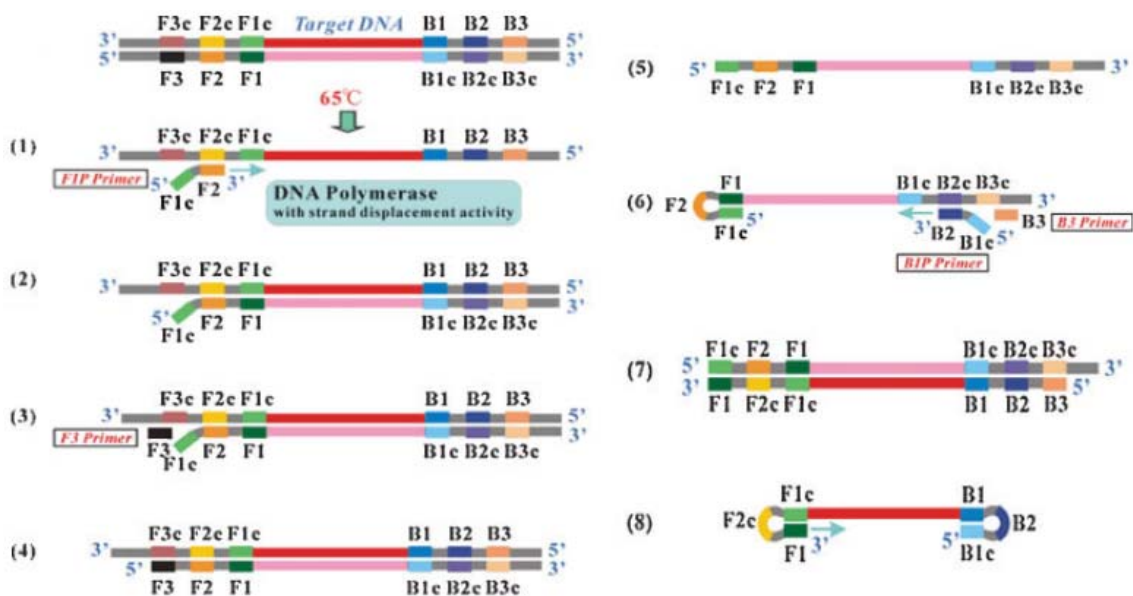


Figura 3: Etapa não cíclica do LAMP: (1) ocorre a separação da dupla fita de DNA, pela ação da enzima *Bst* DNA polimerase, e ligação do FIP; (2) ocorre a síntese da fita à partir de FIP; (3) ocorre a ligação de F3; (4) síntese da fita a partir de F3 e deslocamento da fita formada anteriormente por FIP; (5) a fita deslocada sintetizada a partir de FIP; (6) ocorre ligação de BIP, a fita é sintetizada e, em seguida, liga-se B3; (7) formação da nova fita a partir de B3 e a estrutura de *loop* é linearizada; (8) separação da fita cujas extremidades são os *primers* FIP e BIP que formam os *loops* para, posteriormente, iniciar a etapa cíclica. Fonte: Eiken Chemical Co. Ltd.

Etapa cíclica

Esta etapa se inicia com a ação da enzima em uma das extremidades do haltere que serve de molde para síntese, já que F1 e F1c são complementares. Posteriormente, o *primer* interno FIP se liga à região F2c e inicia-se a síntese de uma nova fita. Em seguida, ocorre amplificação da outra extremidade do

haltere, onde B1 e B1c são complementares e também ocorre deslocamento da fita sintetizada anteriormente e liberação de duas estruturas: a) uma em formato de haltere, a qual ocorrerá a síntese a partir de uma extremidade que serve de molde para amplificação através das regiões complementares, em seguida a ligação de BIP com deslocamento da fita anterior e síntese de nova fita, sendo que este passo é denominado “amplificação cíclica” (*cycling amplification step*), a qual ocorre repetidamente alternando-se os *primers* e extremidades; e b) outra estrutura a qual será feita ligações dos *primers* alternativamente e deslocamento das fitas recém sintetizadas formando, assim, várias estruturas com tamanhos diferentes, todas contendo a sequência alvo. Nesta etapa, denominada “alongamento e reciclagem” (*elongation and recycling step*), é possível a obtenção de várias cópias do alvo (figura 4), com múltiplos *loops* em uma mesma fita, em escala de 10^9 , em menos de 1 hora (Notomi et al., 2000; Ushikubo, 2004; Parida et al., 2008).

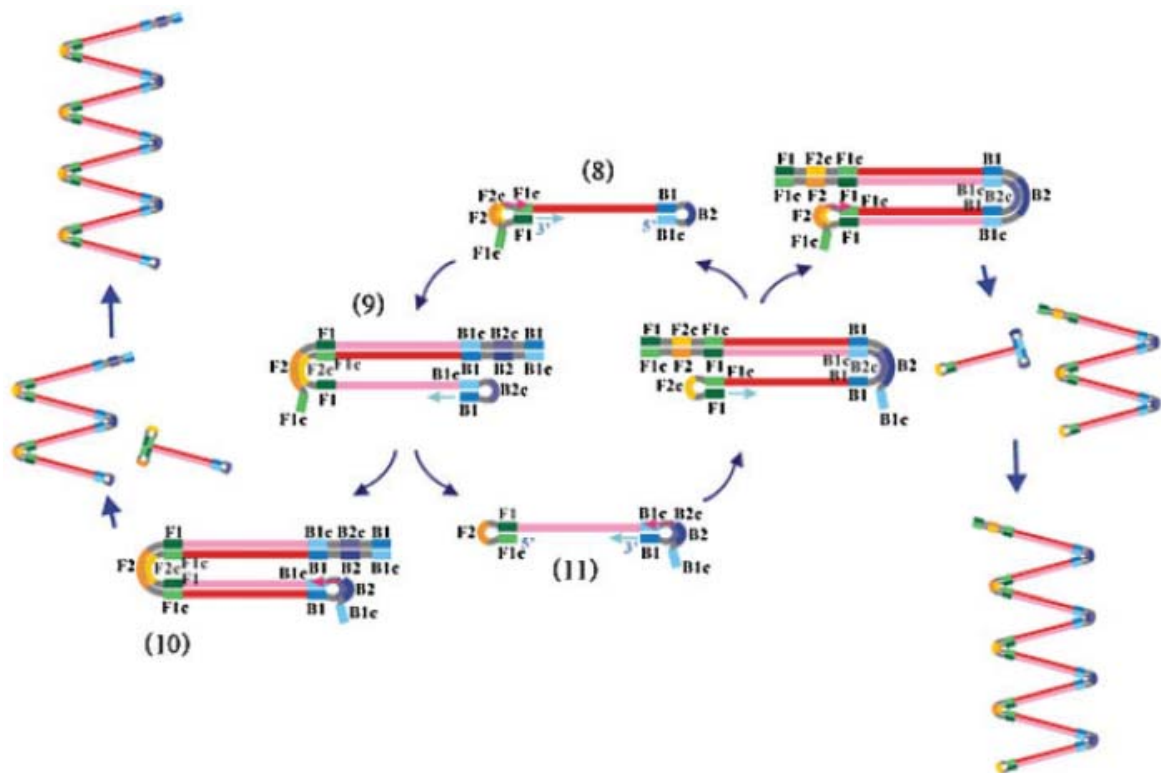


Figura 4: Etapa cíclica do LAMP: (8) início a partir da estrutura em formato de haltere; (9) ocorre a síntese a partir de um dos *loops* e ligação do *primer* interno FIP que inicia a síntese de uma nova fita e deslocamento da fita anterior; (10) formação da estrutura que inicia o ciclo de alongamento que ocorrerá ligação dos *primers* de maneira alternada originando estruturas de tamanhos variados, todos contendo a sequência alvo (11) formação de estruturas em formato de haltere que irá iniciar novamente as etapas (8) e (9) do ciclo de amplificação. Fonte: Eiken Chemical Co. Ltd.

Esta grande quantidade de produto amplificado pode ocasionar contaminações cruzadas (Parida et al., 2008), bem como contaminação por *amplicons* através de aerossol (Tao et al., 2011), sendo necessária a manipulação e execução da técnica com cautela, para evitar resultados inválidos, além da adição de controle negativo em cada incubação, para detectar possíveis contaminações (Parida et al., 2008).

As etapas de preparação do mix, aplicação das amostras e manipulação dos tubos após a reação devem ser feitas em ambientes diferentes do laboratório, além de troca contínua de luvas e utilização de materiais estéreis, como pipetas e ponteiros, são outras medidas importantes a serem seguidas para evitar contaminações, tanto nos reagentes, quanto nos resultados (Enomoto et al., 2005; Kong et al., 2012).

No processo de refinamento da técnica de LAMP, posteriormente foram criados mais um par de *primers*, denominados *Loop primers* (denominados LpF e LpB), os quais aceleram a reação, pois formam novos locais para início da amplificação de DNA, e garante maior especificidade à técnica (Nagamine et al., 2002; Ushikubo, 2004). As posições destes *primers* são entre as regiões de F1 e F2 no sentido de F1 para 2, ou B1 e B2, no sentido de B1 para B2 (figura 5) (Parida et al., 2008). Foi observado uma redução de 33% à 50% do tempo de amplificação, em relação ao tempo das reações sem os *Loop primers*, podendo ter alta amplificação em apenas 30 minutos (Nagamine et al., 2002).

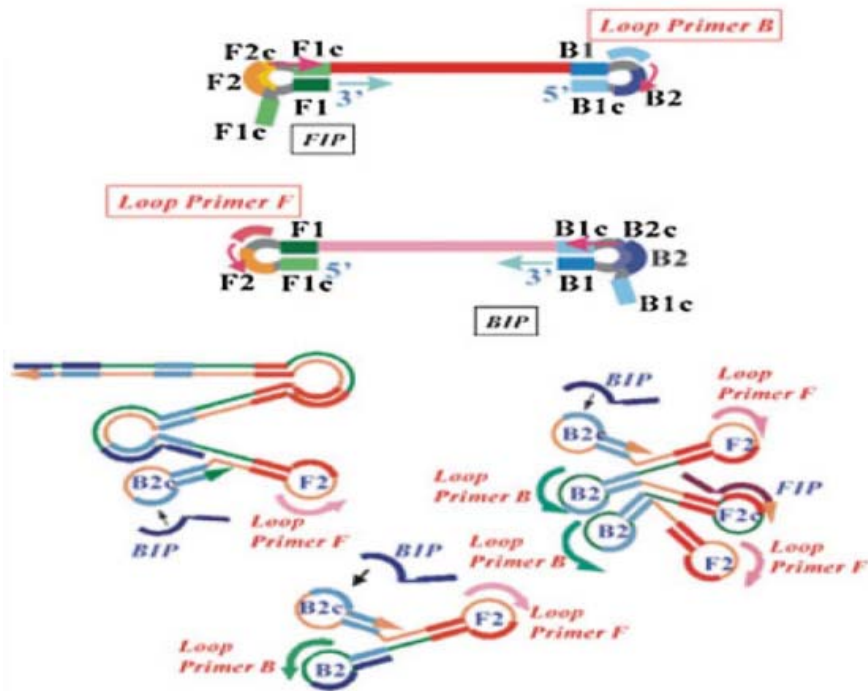


Figura 5: Posição e amplificação utilizando os *primers* LpF e LpB. Os *primers* estão localizados entre as regiões F1 e F2, ou B1 e B2, e é possível observar que a reação se iniciará em 4 *loops* adicionais, aumentando assim o produto amplificado com maior especificidade. Fonte: Eiken Chemical Co. Ltd.

Para que se obtenha um conjunto de *primers* ideal e com boa sensibilidade e especificidade, alguns fatores são importantes, tais como (Eiken Chemical Co. Ltd.):

- A distância entre a extremidade 5' das regiões F2 e B2 deve ser de 120-180pb, e a distância entre F2 e F3, bem como B2 e B3, deve ser de 0-20pb;
- A distância entre as regiões que formam os *loops* (extremidade 5' de F2 à 3' de F1 e a 5' de B2 à 3' de B1) deve ser de 40-60pb.
- Os *primers* devem conter em torno de 50-60% de CG e 40-50% de AT;
- Evitar que ocorra formação de estruturas secundárias, de forma que as extremidades 3' não sejam ricas em AT e nem complementares a outros *primers*.

Além do uso do LAMP para amplificação de DNA, também é possível utilizar a técnica para amplificação de RNA adicionando a enzima transcriptase

reversa juntamente com a enzima *Bst* DNA polimerase, sendo este tipo de reação denominado de RT-LAMP (Whiting & Champoux, 1998). Para que ocorra a reação, é feita a ligação do *primer* FIP à região F2c do RNA e a síntese da fita complementar que é o cDNA. Em seguida, o F3 se liga ao RNA para síntese de uma nova fita, o que causa o deslocamento da fita do cDNA que será liberada em formato de haltere, que seguirá os demais passos do processo de amplificação do LAMP, como descrito anteriormente (figura 6) (Okafuji et al., 2005).

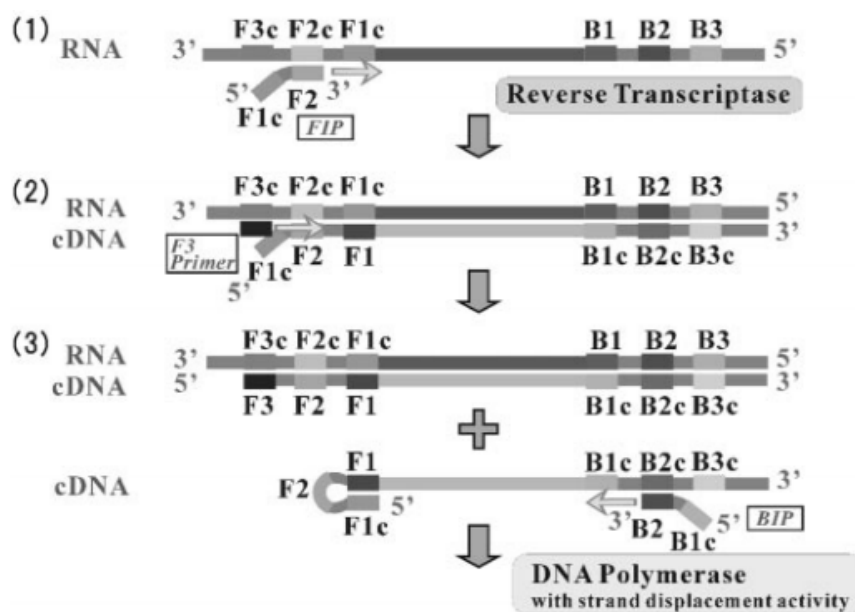


Figura 6: RT-LAMP a partir de uma fita de RNA. (1) ocorre a ligação do FIP ao RNA; (2) amplificação da fita complementar (cDNA) do RNA e ligação do *primer* F3; (3) síntese da fita a partir do F3 e deslocamento da fita de cDNA (Okafuji et al., 2005).

Outra aplicação do LAMP consiste no estudo de SNPs, já que a técnica se mostrou bastante específica e precisa. É possível discriminar a presença de SNPs já que a reação não amplifica aquelas amostras que apresenta apenas um nucleotídeo de diferença em relação à sequência alvo (figura 7). Para que não ocorra a amplificação das sequências mutadas, os *primers* FIP e BIP são desenhados baseados no tipo selvagem e, quando ocorre o SNP, não há formação da estrutura em formato de halteres, o que impede a amplificação e

diferenciação entre as sequências selvagens e mutadas (Parida et al., 2008). A partir deste princípio, a técnica tem sido utilizada para verificar a presença de polimorfismos genotípicos, através de SNP, além de polimorfismos associados à artrite reumatoide e mutações em *Anopheles gambiae* (Badolo et al., 2012; Iwasaki et al., 2003; Nakamura et al., 2007).

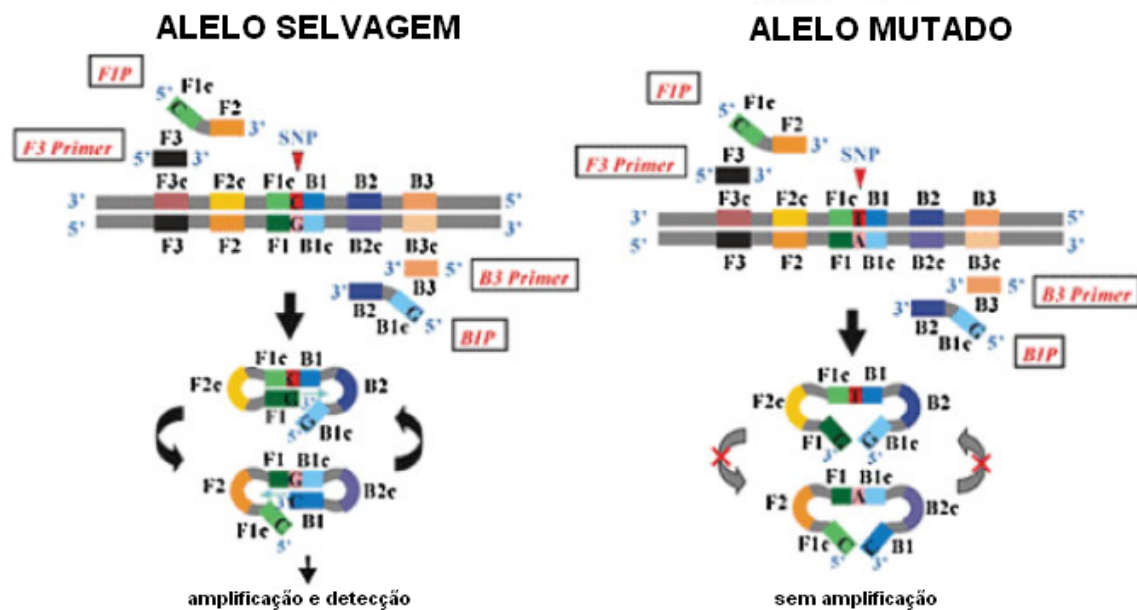
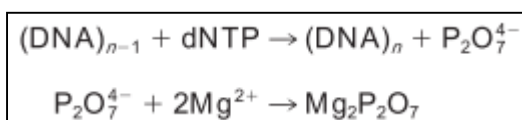


Figura 7: LAMP para diferenciação de sequências mutadas contendo SNP. No alelo selvagem, os primers FIP e BIP se ligam e permite que ocorra a amplificação. Já no alelo mutado, onde ocorre o SNP, os primers FIP e BIP não se ligam, o que impede a formação da estrutura em forma de haltere e, assim, não ocorre a amplificação. Fonte: Eiken Chemical Co. Ltd.

Após a reação da técnica, é possível a visualização de resultados em gel de agarose, no qual o resultado do LAMP se apresenta de maneira característica através de um rastro e diversas bandas, os quais representam a amplificação e formação de fragmentos de tamanhos variados (Notomi et al., 2000). Esta manipulação dos tubos após amplificação para aplicação no gel pode ocasionar contaminações, liberação de amplicons e a necessidade de manipular corantes carcinogênicos, como o brometo de etídeo (Khan et al., 2012). Diante destes fatores, outras medidas para visualização dos resultados foram desenvolvidas.

No LAMP, a reação de amplificação do DNA libera íons pirofosfato a partir da ligação de dNTPs, sendo que esses íons reagem com os íons Mg^{2+}

presentes no tampão de reação do LAMP formando pirofosfato de magnésio, o qual é um subproduto da reação insolúvel. Este subproduto da reação gera um precipitado (o qual não é formado nas reações de PCR convencional) que possibilita verificar o resultado da reação LAMP sem a necessidade de eletroforese. Esta reação de precipitado pode ser representada através das reações a seguir (Mori et al., 2001):



A partir deste subproduto, é possível diferenciar as reações positivas em relação às negativas, através da turbidez, à olho nu ou utilizando um espectrofotômetro, de forma que os positivos apresentam uma solução turva em relação aos negativos, ou centrifugando os tubos e observando a presença (positivos) ou não do acúmulo de precipitado em cada tudo. Através do aumento da turbidez devido ao aumento do precipitado, é possível fazer uma correlação entre o precipitado e a quantidade de síntese de DNA, além da possibilidade de se fazer um acompanhamento em tempo real através da medição da turbidez, via turbidímetro (Mori et al., 2001).

Através do pirofosfato de magnésio produzido pelo LAMP, é possível a utilização do azul de hidroxinaftol (HNB – *Hydroxy Naphtol Blue*, Sigma) para análise dos resultados. O HNB é um reagente indicador de metal para cálcio e um reagente colorimétrico para íons de metais alcalinos terrosos, cuja utilidade foi provada na titulação de Mg^{2+} . Na reação do LAMP, o HNB reage com os íons magnésio mudando a cor da reação de violeta (negativos) para azul (positivos) (Goto et al., 2009). Como o HNB é colocado antes de ocorrer a reação de amplificação, reduz a possibilidade de contaminação devido a elevada quantidade de cópias obtidas após a reação (Njiru et al., 2008).

Outra forma de observar os resultados consiste na utilização de corantes fluorescentes intercalantes, como SYBR Green I. Após a reação, já que foi descrito que o SYBR Green I inibe a amplificação (Tao et al., 2011), adiciona-

se 1µL do corante fluorescente em cada tubo e a cor dos tubos positivos mudam para verde fluorescente, enquanto que os negativos continuam com a cor laranja original. É possível também observar os resultados sob luz UV, através da diferença entre os tubos positivos, os quais apresentam alta fluorescência, em relação aos negativos (Parida et al., 2008).

2 JUSTIFICATIVA

A bactéria *Wolbachia* vem sendo utilizada em programas de campo como forma alternativa (ou aditiva) ao controle de Dengue em vários países. Durante a soltura de mosquitos *A. aegypti* contendo *Wolbachia*, é necessário o monitoramento semanal de mosquitos coletados na área para verificar a presença e disseminação da *Wolbachia*. Este trabalho é hoje realizado por PCR quantitativo, uma técnica ainda de custo alto. Diante disto, é necessário que seja criado um método rápido, sensível e de baixo custo para diagnóstico no campo em larga escala, já que há a possibilidade de expansão deste projeto em países que não possuam infraestrutura necessária para realização desta técnica.

O LAMP vem sendo utilizado como ferramenta para diagnóstico em várias doenças, detecção de genes alvos e de diversos micro-organismos, como *Leishmania* (Khan et al., 2012), *Toxoplasma gondii* (Kong et al., 2012) e *Plasmodium vivax* (Tao et al., 2011), incluindo bactérias semelhantes à *Wolbachia*, como *Brucella* spp. (Song et al., 2012), *Anaplasma ovis* (Ma et al., 2011) e *Ehrlichia ruminantium* (Nakao et al., 2010), além de ensaios para detecção de DNA genômico, RNA e também sendo possível sua quantificação em tempo real (Mori et al., 2001).

No presente estudo, propusemos aplicar a técnica do LAMP, que tem se mostrado como uma metodologia simples, sensível, de baixo custo e altamente específica, para detecção de *Wolbachia* para fins de monitoramento de insetos que serão liberados em campo para controle de doenças. Essa técnica poderá também ser utilizada para a realização de levantamento de espécies de insetos naturalmente infectadas pela bactéria no ambiente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Utilizar o LAMP como um método simples e rápido de detecção de *Wolbachia* em insetos para fins de monitoramento.

3.2 Objetivos específicos

- Gerar *primers* específicos para a *Wolbachia* para uso no LAMP;
- Padronizar a técnica para que seja possível sua execução tanto em termociclador, como em banho seco;
- Determinar a sensibilidade da técnica na detecção de *Wolbachia*;
- Determinar a especificidade do LAMP frente a diferentes;
- Utilizar o azul de hidroxinaftol (*Hidroxy Naphtol Blue*, HNB) e SYBR Green I como metodologias de visualização dos resultados;
- Demonstrar as diferenças de custos para a realização da técnica de PCR convencional x LAMP.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostras de insetos

Os mosquitos *Aedes fluviatilis*, naturalmente infectados com a cepa de *Wolbachia* wFlu (Moreira et al., 2009), utilizados neste trabalho foram provenientes de populações naturais que são mantidas no Insetário do Laboratório de Malária do CPqRR, além de mosquitos *Aedes aegypti*, oriundos da Austrália, que foram infectados artificialmente com duas cepas diferente de *Wolbachia*, wMel (Walker et al., 2011) e wMelPop (McMeniman et al., 2009), ambas infectadas individualmente. Estes mosquitos foram mantidos sob temperatura média de 27°C, umidade relativa do ar média de 70% ($\pm 10\%$) e fotoperíodo de 12 horas. As larvas foram mantidas em bandejas de plástico (30 cm x 20 cm) com água desclorada e alimentadas com as rações para peixes Goldfish Colour – Alcon (para *A. fluviatilis*) e Tetramin Tropical Flakes – Tetra (para *A. aegypti*), e os adultos alimentados com solução de sacarose a 10%. Além disso, foram utilizados mosquitos de campo doados por colaboradores, como *Culex* sp. e *A. albopictus*, juntamente com outros insetos de diferentes ordens: Hymenoptera, Hemiptera, Lepidoptera, Orthoptera, Siphonaptera, Coleoptera e Isoptera. Estes insetos foram coletados, processados e confirmados como positivos para *Wolbachia*, por pelo menos dois *primers* (*WSP*, *16S* ou *ftsZ*), pelo nosso grupo de pesquisa (manuscrito em revisão) para validação da técnica. Foram incluídos também mosquitos que não são naturalmente infectados, como as espécies *Anopheles aquasalis*, que também é mantida na colônia do Insetário do Laboratório de Malária do CPqRR, e *A. aegypti* selvagem, os quais foram coletados em campo por meio de armadilhas BG-Sentinela no projeto Eliminar a Dengue – Desafio Brasil.

4.2 Técnicas moleculares

4.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA genômico total de cada indivíduo foi realizada pela maceração (utilizando o equipamento Mini-Beadbeater-16 / BioSpec) em 80 µL de solução de homogeneização (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl [pH 8,2]) (modificado de FU et al., 2010) em tubos de 1,5 mL contendo uma *bead* de vidro de 3 mm por 1,5 minutos e posterior centrifugação a 13000 rpm por 30 segundos à 4°C. Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 minutos à 97°C, mantidas no gelo por, pelo menos, 15 minutos, finalizando com centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos à 4°C e diluição em 1:10 do sobrenadante em água MilliQ autoclavada (Baton et al., 2013). Após extração, as amostras foram mantidas à -20°C até o momento da realização dos experimentos.

4.2.2 Padronização da Amplificação isoterma mediada por *loop* (LAMP)

Inicialmente, para padronização da técnica, utilizamos 2 pares de *primers* desenhados no PrimerExplorer V4 (<http://primerexplorer.jp/e/>) baseando-se na sequência do gene *16S* ribossomal da *Wolbachia* (Simoes et al., 2011), como descrito por Notomi e colaboradores em 2000.

Tabela 1: Sequências dos 4 *primers* para uso no LAMP.

Primer	Sequência (5' → 3')
F3	GGT TTC ACA CAG GTG TTG CA
B3	GGG CCA TGA TGA CTT GAC AT
FIP	ATG AGG GTT GCG CTC GTT GCC TGT CGT CAG CTC GTG TC
BIP	ACC ATC AGG TAA TGC TGG GGA CCA TCC CCA CCT TCC TCCA

Para iniciar a padronização da amplificação por LAMP, as reações com volume final de 25 µL continham 1X tampão de Reação ThermoPol (20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 10 mM de KCl, 10 mM de (NH₄)₂SO₄, 2 mM de MgSO₄, 0,1% de Triton X-100), 1,4 mM de cada dNTP, 0,6 µM de cada *primer* interno (FIP e BIP), 0,2 µM de cada *primer* externo (F3 e B3), 0,8 M de Betaína (Sigma), 8 U da enzima *Bst* DNA polimerase (New England Biolabs) e aproximadamente 150 ng de DNA de amostras de insetos.

Devido ao longo período de incubação necessário para que se obtenha a amplificação, (em torno de 150 minutos) adicionamos os *primers loop* os quais demonstraram reduzir o tempo da amplificação (Nagamine et al., 2002). Desta forma, desenhamos novos *primers* com os *Loop* adicionais para acelerar o processo de reação para detecção de *Wolbachia* através da amplificação isotermal. Através do gene 16S ribossomal da bactéria. Os 6 *primers* (tabela 2) foram desenhados no software LAMP Designer 1.02 (PREMIER Biosoft Internacional), baseados na sequência do gene (Figura 8) da bactéria (Simoes et al., 2011).

Tabela 2: Sequências dos 6 *primers* para uso no LAMP.

<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')
F3	CTC GTG TCG TGA GAT GTT G
B3	GAA CGT ATT CAC CGT GGC
FIP	CCC ACT CCA TAA GGG CCA TGA GGG AC
BIP	CAA TGG TGG CTA CAA TGG GCT GGC AG
LoopF	CCA CCT TCC TCC AGT TTA TCA
LoopB	CGC GAG GCT AAG CTA ATC C

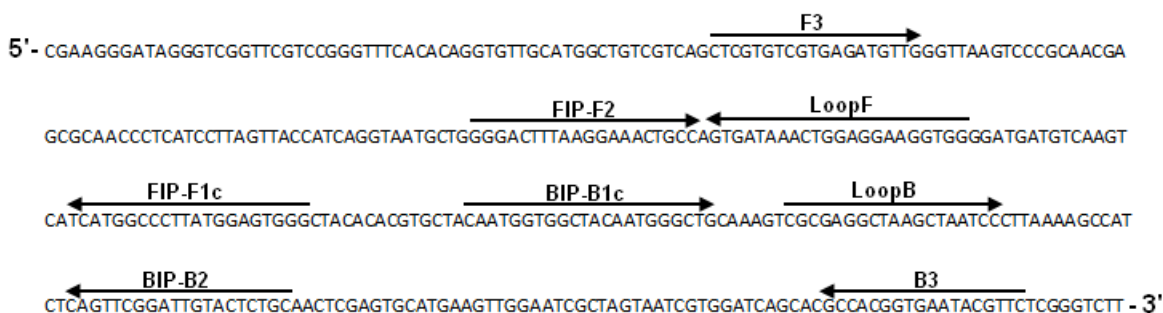


Figura 8: Representação esquemática de parte da sequência do gene 16S da *Wolbachia* e o local de anelamento de cada *primer*. FIP e BIP são as combinações de F2 e F1c e B1C e B2, respectivamente.

Para iniciar a padronização da amplificação por LAMP, as reações com volume final de 25µL continham 1X tampão de Reação ThermoPol (20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 10 mM de KCl, 10 mM de (NH₄)₂SO₄, 2 mM de MgSO₄, 0,1% de Triton X-100), 0,32 mM de cada dNTP, 0,64 µM de cada *primer* interno (FIP e BIP), 0,2 µM de cada *primer* externo (F3 e B3), 0,32 µM dos *primers* LoopF e LoopB, 0,64 M de Betaína (Sigma), 6U da enzima *Bst* DNA polimerase (New England Biolabs) e aproximadamente 30 ng de DNA de *A. fluviatilis* (infectado naturalmente pela cepa *wFlu*) e *A. aegypti* (infectado artificialmente com a cepa *wMel*). As reações foram incubadas no termociclador à 63°C e, após diferentes períodos de incubação (30 min, 60 min, 90 min, 120 min e 150 min), as amostras foram retiradas para avaliar qual tempo de incubação era o mais indicado para obter a amplificação.

A visualização dos resultados da amplificação do LAMP foi realizada através de gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo (Sigma) e, além disso, foram feitas reações tanto em termociclador, como em banho seco, para que a técnica pudesse ser utilizada sem a necessidade de equipamentos sofisticados, reduzindo os custos para sua execução em campo.

Foram feitas reações da técnica LAMP com diferentes concentrações da enzima para verificar sua eficiência e funcionalidade, reduzindo ainda mais o custo deste reagente por reação. Foram utilizadas 6U, 4U, 2U e 1U de enzima *Bst* DNA polimerase por reação, sendo que a concentração dos demais reagentes foi mantida. As amostras utilizadas foram de mosquitos *A. aegypti* infectados por *wMel* da colônia já estabelecida no Laboratório de Malária.

4.2.3 Avaliação da sensibilidade do LAMP

Para avaliação da sensibilidade, foi realizado uma PCR convencional com os *primers* externos F3 e B3, gerando um fragmento de 315 pb. A reação foi realizada em termociclador automático (Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems), utilizando as seguintes condições: desnaturação de 94°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, anelamento à 60°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 30 segundos, finalizando com uma extensão final de 72°C por 5 minutos. A reação, com volume final de 15µL continha 1x de Tampão de PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl); 0,13 µM de cada *primer* (F3 e B3); 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen); 1,5 mM de MgCl₂; 0,7 U de enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e cerca de 30 ng de DNA total de *A. aegypti* infectado artificialmente por *wMelPop*. O produto foi visualizado em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo, sob luz UV. O produto amplificado foi purificado usando o QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN) e, a partir deste produto purificado, foi feita a clonagem do fragmento em plasmídeo pGem-T Easy Vector System (Promega), seguindo as instruções do fabricante, e incubação *overnight* à 4°C. As células competentes de *Escherichia coli* Top10F® (Invitrogen) foram transformadas com o plasmídeo recombinante através da técnica de choque térmico (45 segundos de incubação à 42°C e 2 minutos no gelo), e foram plaqueadas em meio de cultura LB-ágar contendo ampicilina (100 µg/mL), 100 µL de IPTG (100 mg/mL) e 20 µL de X-Gal (50 mg/mL) (Promega) para realização de *screening* de colônias azuis ou brancas. As placas foram mantidas *overnight* em estufa à 37°C para crescimento das colônias brancas, as quais devem conter o inserto de interesse. No dia seguinte, algumas colônias brancas foram individualmente transferidas para tubos com 1 mL de meio LB e foram incubadas por 1 hora à 37°C. Em seguida, as amostras incubadas foram submetidas a um protocolo rápido de extração, que se inicia com centrifugação por 5 minutos à 5000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 100 µL de água MiliQ. As amostras foram incubadas à 95°C por 5 minutos no banho seco, em seguida centrifugadas por 5 minutos à 13000 rpm e foram usados 2 µL de cada amostra de colônia para a reação de PCR, seguindo o protocolo anterior.

Após confirmação do inserto, quatro amostras foram selecionadas para purificação do DNA plasmidial com o QIAprep Miniprep kit (QIAGEN) e posteriormente à digestão com a enzima *EcoR* I, que separa o inserto do plasmídeo, e a *Pst* I, que lineariza os plasmídeos, para assim gerar as diluições seriadas. Duas amostras foram selecionadas para purificação com o QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) e finalmente quantificadas no Nanodrop (Thermo Scientific) para estabelecer o número mínimo de cópias da sequência do gene alvo que é detectado pelo LAMP. Foi feito o cálculo para determinar o número de moléculas por μL para, por fim, serem feitas as diluições seriadas do DNA do plasmídeo de 10^9 à 10^0 para avaliação da sensibilidade analítica da técnica através do cálculo abaixo:

$$\text{Peso em Daltons (g/mol)} = \frac{(\text{pb do plasmídeo} + \text{inserto})(330\text{Da} \times 2 \text{ nucleotídeos/pb})}{\text{Número de Avogadro } 6,02214199 \times 10^{23}}$$

$$\frac{(3015 + 315)(330\text{Da} \times 2)}{6,02214199 \times 10^{23}} = 3,64 \times 10^{-18} \text{g/mol}$$

$$\frac{\text{Concentração de plasmídeos (g/}\mu\text{L) Nanodrop}}{\text{Número de cópias}} = \frac{5,2 \times 10^{-9} \text{g/}\mu\text{L}}{3,64 \times 10^{-18} \text{g/mol}}$$

Número de moléculas = $1,43 \times 10^9$ moléc/ μL

4.2.4 Avaliação da especificidade do LAMP

Para verificar a especificidade dos *primers* em relação a outras bactérias, foram feitas reações utilizando diferentes espécies, em colaboração com o Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia da UFMG. As espécies de bactérias utilizadas foram: *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Ochrobactrum intermedium*, *Pantoea* sp, *Serratia marcescens* e *Serratia* sp.

As bactérias foram recebidas em placas, as quais foram retiradas fragmentos de cada colônia e transferidas, individualmente, para tubos Falcon

contendo 5 mL de meio LB líquido e foram incubadas sob agitação à 37°C *overnight*. Após incubação, 1 mL de cada tubo foi transferido para tubos de microcentrifuga e, em seguida, as alíquotas foram incubadas à 95°C por 5 minutos no banho seco, centrifugadas por 5 minutos à 13000rpm e foi usado 1 µL de cada espécie de bactéria nas reações de LAMP, seguindo a metodologia padronizada.

4.2.5 Utilização do HNB e SYBR Green I para visualização dos resultados

Uma forma alternativa de se observar os resultados, sem a utilização da eletroforese em gel de agarose, consiste na utilização do azul de hidroxinaftol, o que permite diferenciar as amostras positivas das negativas a olho nu. Na reação do LAMP, o HNB reage com os íons magnésio mudando a cor da reação de violeta (negativos) para azul (positivos). Para padronização da técnica proposta, o HNB foi adicionado ao tampão de reação na concentração de 1,2 mM (Goto et al., 2009).

Outra metodologia padronizada para visualização dos resultados foi através do SYBR Green I, a qual requer luz UV (Parida et al., 2008). Para visualização, é adicionado 1 µL (1:1000) do corante em cada tubo após a reação, onde os positivos apresentam fluorescência em relação aos negativos. Para confirmação dos resultados, em ambas as metodologias, o produto de cada reação foi aplicado em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV.

4.2.6 Diferença de custos PCR x LAMP

Para analisar os custos entre os reagentes de ambas as técnicas, incluindo aqueles utilizados para visualização dos resultados, foi feito o cálculo do valor, em reais, para realização de cada reação. Os cálculos foram baseados nos valores de compra de cada reagente no mercado brasileiro no catálogo dos fabricantes, tanto do PCR convencional, quanto do LAMP.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização do LAMP

No presente trabalho, conseguimos padronizar a técnica do LAMP para detecção de *Wolbachia* em diversos hospedeiros, incluindo insetos de diversas ordens e em mosquitos de campo, bem como em mosquitos da colônia do Insetário do Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz MG. Estes indivíduos utilizados eram tanto infectados naturalmente, como *A. fluviatilis* e insetos coletados no campo de diferentes ordens, ou artificialmente transfectados pela *Wolbachia*, como mosquitos *A. aegypti*, além de mosquitos não infectados, como *A. aegypti* selvagem e *A. aquasalis* (Gonçalves et al., 2014).

Para padronização da técnica, amostras de *A. fluviatilis* infectados com *wFlu* e *A. aegypti* com *wMel*, foram incubadas por diferentes tempos para determinar o tempo necessário para que ocorresse a amplificação. O resultado foi observado em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídeo (figura 9).

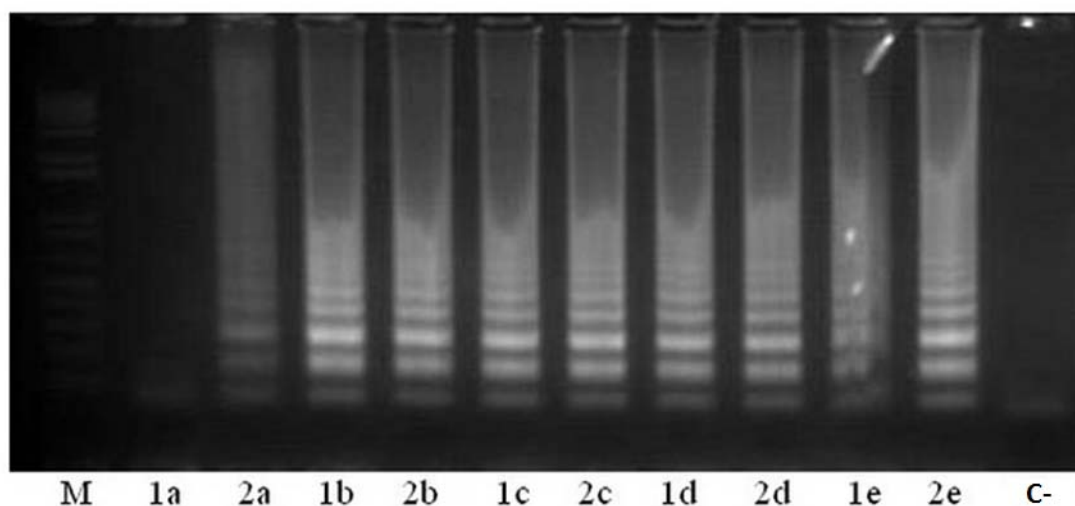


Figura 9: Padronização do tempo de incubação para amplificação através do LAMP. Foram utilizadas amostras de (1) *A. fluviatilis* infectado naturalmente por *Wolbachia* (*wFlu*) e (2) *A. aegypti* infectado artificialmente com *wMel*. As amostras foram incubadas à 63°C em termociclador e os tubos foram removidos em diferentes tempos: (a) 30 min, (b) 60 min, (c) 90 min, (d) 120 min e (e) 150 min. M: marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen). C-: controle negativo.

Foi observado que a amplificação ocorreu à partir de 60 minutos de incubação mas, para garantir a amplificação nas amostras que possuem uma baixa densidade de *Wolbachia*, a reação foi padronizada com o tempo de 90 minutos de incubação à 63°C (Gonçalves et al., 2014).

Durante a padronização, tivemos problemas de contaminações dos reagentes, além do controle negativo das reações, o que dificultou o desenvolvimento da técnica para detecção de *Wolbachia*.

Após padronização, diversas amostras, tanto de campo, quanto de colônia, foram submetidas à técnica. Foram utilizadas amostras de mosquitos selvagens não infectados, como *Aedes aegypti* e *Anopheles aquasalis*, mosquitos naturalmente infectados, como *Aedes albopictus*, *Aedes fluviatilis* e *Culex* sp., e duas linhagens de *A. aegypti*, uma infectada por *wMel* e *wMelPop*, incluindo insetos de diferentes ordens, positivos para *Wolbachia*, confirmados anteriormente. As amostras foram incubadas à 63°C por 90 minutos e o resultado foi visualizado em gel de agarose corado com brometo de etídeo (figura 10).

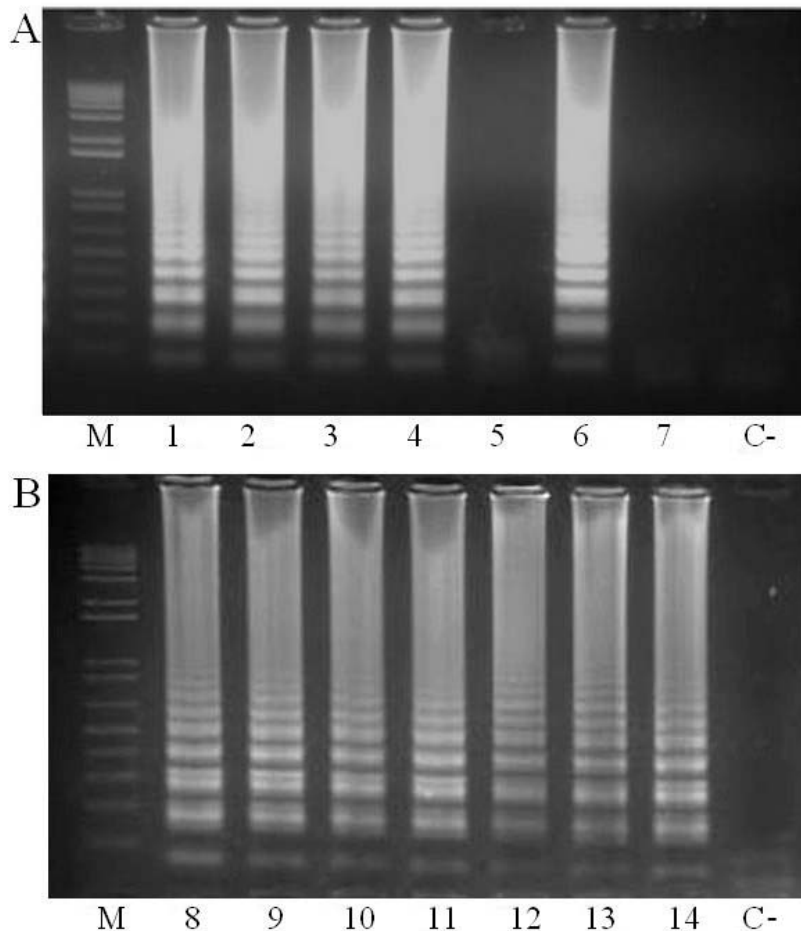


Figure 10: Especificidade e reprodutibilidade do LAMP em diferentes insetos. Amostras de mosquitos (Diptera): (1) *A. albopictus*, (2) *A. fluviatilis*, (3) *A. aegypti* wMel, (4) *A. aegypti* wMelPop, (5) *A. aegypti*, (6) *Culex* sp e (7) *An. aquasalis*. Amostras de insetos de outras ordens (8) Hymenoptera, (9) Hemiptera, (10) Lepidoptera, (11) Orthoptera, (12) Siphonaptera, (13) Coleoptera e (14) Isoptera. Somente as amostras positivas para *Wolbachia* (confirmadas anteriormente) amplificaram. M: marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen).C-: controle negativo.

Para o desenvolvimento da metodologia da técnica e na grande maioria dos trabalhos que utilizam o LAMP, a concentração utilizada da enzima *Bst* DNA polimerase é de 8U por reação (Notomi et al., 2000; Fujino et al., 2005; Nakao et al., 2010). Após padronização e verificação da sensibilidade da técnica, para uma maior redução do custo da reação para detecção de *Wolbachia*, foram feitas diferentes reações reduzindo a quantidade de *Bst* DNA polimerase. As concentrações utilizadas da enzima foram de 6U, 4U, 2U e 1U por reação. Após incubação, utilizando amostras de *A. aegypti* infectadas artificialmente por wMel, o resultado foi visualizado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (figura 11).

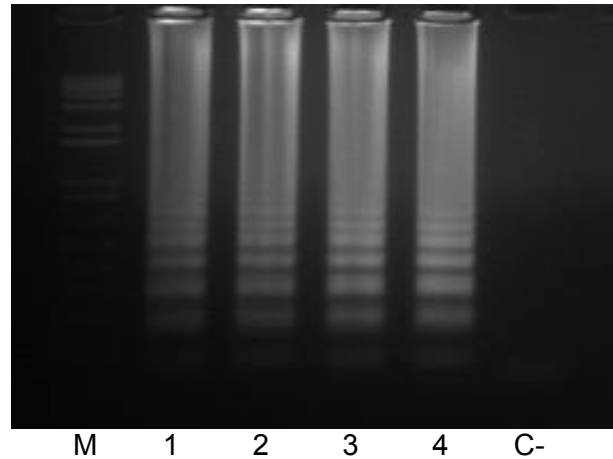


Figura 11: Reações de LAMP com 30ng de DNA total de *Aedes aegypti* infectadas com wMel utilizando diferentes quantidades de enzima. 1) 6U; 2) 4U; 3) 2U e 4) 1U de enzima. Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo. M: marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen), C-: controle negativo.

Foi observado que, utilizando apenas 1U por reação da enzima *Bst* DNA polimerase, é possível obter a amplificação de maneira eficiente nas amostras com 30 ng de DNA total de *A. aegypti* infectado artificialmente por *Wolbachia* (Gonçalves et al., 2014).

5.2 Sensibilidade do LAMP

Para a análise da sensibilidade da técnica, foram feitas diluições seriadas através da clonagem do inserto contendo o *amplicon* gerado a partir da PCR convencional utilizando os *primers* externos F3 e B3. Os pontos 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^1 e 10^0 foram submetidos ao LAMP seguindo a padronização estabelecida neste trabalho. As amostras foram incubadas à 63°C por 90 minutos, tanto em termociclador (12A), como em banho seco (figura 12B), e o resultado foi observado em gel de agarose a 1,5%.

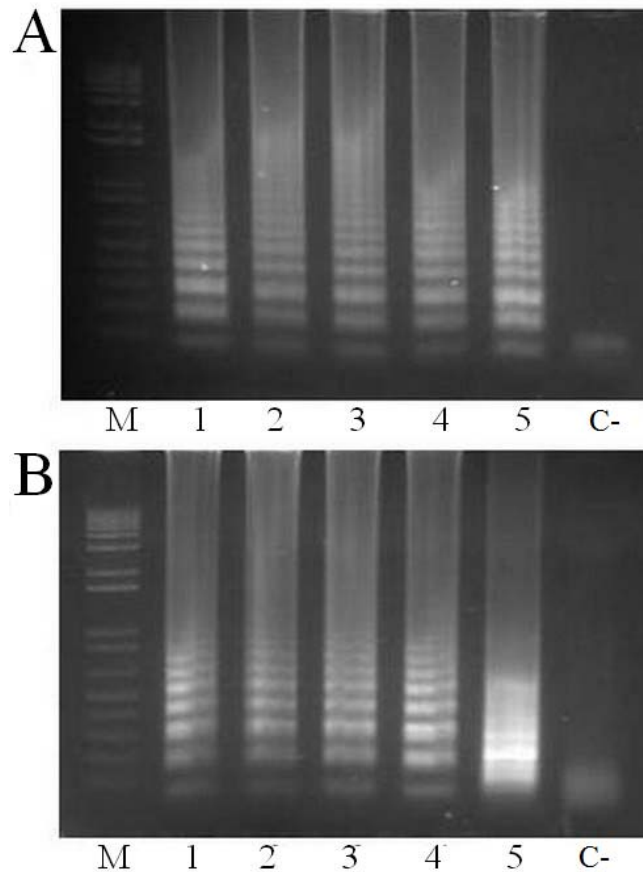


Figura 12: Avaliação da sensibilidade da técnica utilizando as diluições (1) 10^7 , (2) 10^5 , (3) 10^3 , (4) 10^1 e (5) 10^0 . As diluições foram incubadas em (A) termociclador e em (B) banho seco à 63°C por 90 minutos. Foi possível obter amplificação com apenas 1 cópia da sequência alvo. C-: controle negativo.

Foi possível obter a amplificação utilizando apenas 1 cópia do plasmídeo contendo a sequência alvo, o que confirma a alta sensibilidade da técnica (Gonçalves et al., 2014).

Para padronizar a utilização de apenas 1U de enzima em diferentes amostras, foi feita a reação do LAMP com as diluições 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^1 e 10^0 , em termociclador para verificar se a sensibilidade da técnica poderia ser reduzida devido a menor quantidade de enzima por reação. As amostras foram incubadas à 63°C por 90 minutos e o resultado foi visualizado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (figura 13).

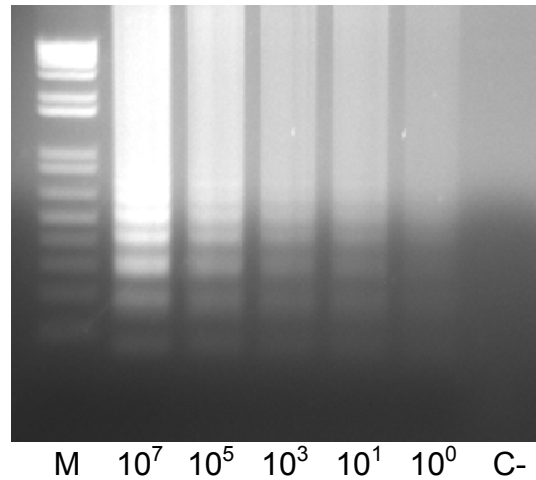


Figura 13: Reações de LAMP com as diluições seriadas e utilizando apenas 1U de enzima por reação. Com apenas 1 cópia da sequência alvo foi possível a amplificação. As amostras foram incubadas em termociclador e visualizadas em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo. M: marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen), C-: controle negativo.

Através deste resultado, utilizando apenas 1U de enzima, a sensibilidade da técnica se mantém, obtendo-se amplificação quando utilizado somente 1 cópia da sequência alvo.

5.3 Especificidade do LAMP

Visto que, no intestino de insetos, há uma vasta microbiota natural com diversas bactérias e outros microorganismos (Minard et al., 2013; Yun et al., 2014), e que foi utilizado o DNA total dos insetos, a técnica LAMP para detecção de *Wolbachia* se mostrou específica para aqueles indivíduos que albergam a bactéria *Wolbachia*, sem aparente inespecificidade com outras bactérias da microbiota, visto que insetos sabidamente negativos para *Wolbachia* não apresentaram amplificação (Gonçalves et al., 2014).

Além das amostras utilizadas para o desenvolvimento do trabalho, tanto aquelas positivas para *Wolbachia*, como de outros insetos naturalmente não infectados, foi feito o LAMP utilizando diferentes amostras de bactérias para confirmar a especificidade da técnica frente à diferentes organismos. Para isto, foram utilizadas amostras de *B. sphaericus*, *B. cereus*, *M. luteus*, *O. intermedium*, *Pantoea sp*, *S. marcescens* e *Serratia sp*. As amostras foram

incubadas em termociclador à 63°C por 90 minutos e o resultado foi visualizado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (figura 14).

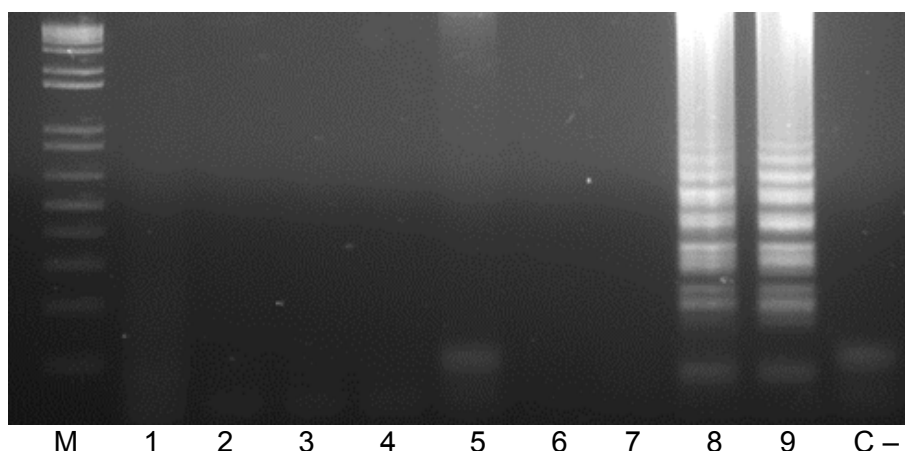


Figura 14: LAMP com diferentes espécies de bactérias para verificar a especificidade da técnica. 1) *B. sphaericus*; 2) *B. cereus*; 3) *M. luteus*; 4) *O. intermedium*; 5) *Pantoea sp*; 6) *S. marcescens*; 7) *Serratia sp*; 8) *A. fluviatilis* infectado naturalmente com wFlu; 9) *Aedes aegypti* infectado artificialmente por wMel; M: marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen). C-: controle negativo.

Através deste resultado, foi possível confirmar a especificidade da técnica em relação a outras bactérias, além daquelas que estão naturalmente presentes nos insetos, as quais não interferem na amplificação para *Wolbachia*. Estes resultados corroboram a alta especificidade apresentada pela técnica através dos 3 pares de *primers*, os quais se ligam a 8 regiões distintas do DNA alvo (figura 8).

5.4 HNB e SYBR Green I para visualização dos resultados

Uma alternativa para visualização dos resultados, como proposto por Goto e colaboradores, é através do azul de hidroxinaftol (HNB), o que possibilita a análise de resultados à olho nu. Foi adicionado 1,2 mM do corante no tampão da reação e as amostras foram incubadas à 63°C por 90 minutos (figura 15A). Como não possível diferenciar os positivos dos negativos,

visualmente, foi aumentado o tempo de incubação para 150 minutos (figura 15B) para melhor distinção entre os azuis (positivos) e violetas (negativos).

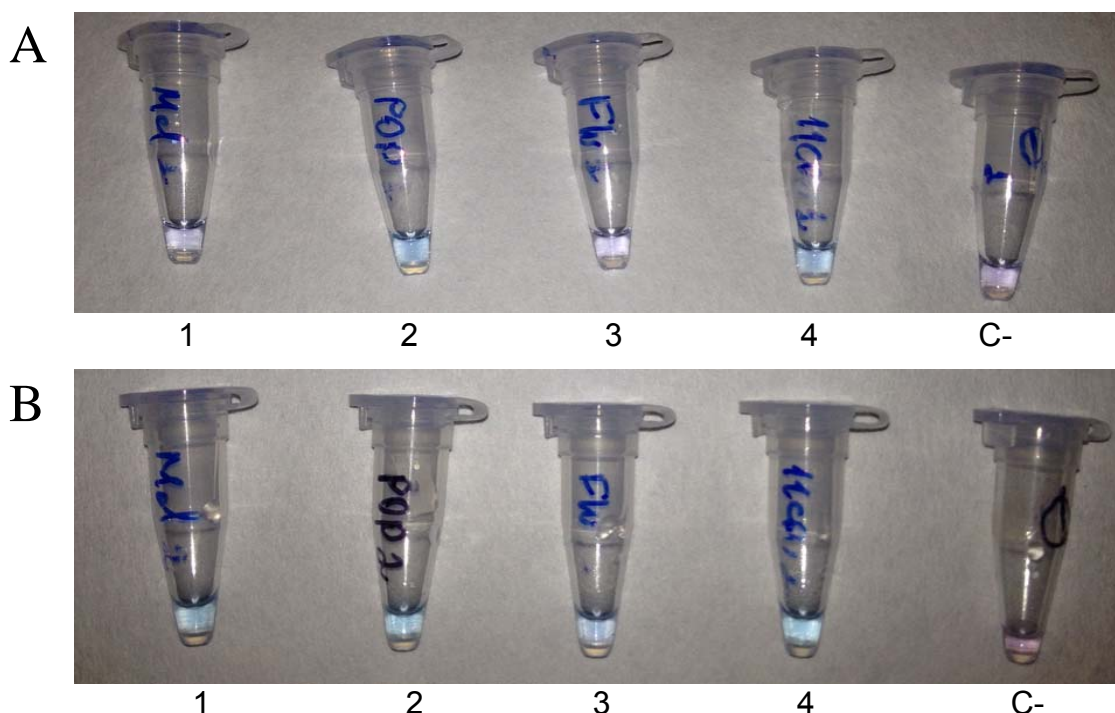


Figura 15: Utilização do UNB para visualização dos resultados à olho nu. Inicialmente, as amostras foram incubadas à 63°C por (A) 90 minutos. Como as amostras positivas não tiveram uma nítida diferença entre o controle negativo, o tempo de incubação foi aumentado para (B) 150 minutos. As amostras utilizadas foram (1) *Aedes aegypti* com wMel, (2) *A. aegypti* com wMelPop, (3) *A. fluviatilis* com wFlu, (4) *Drosophilidae*. C-: controle negativo.

Foi possível a padronização da visualização dos resultados utilizando o HNB, o que permite diferenciar as amostras positivas (azuis) daquelas negativas (violetas) sem a necessidade de géis de agarose e manipulações de corantes perigosos, como o brometo de etídeo, e sem o uso de outros equipamentos, como luz UV (Gonçalves et al., 2014).

Além do uso do HNB, uma outra alternativa para análise dos resultados sem o uso de géis de agarose, consiste na adição de SYBR Green I após a reação e visualização sob luz UV (302 nm). Após a incubação, foi adicionado 1 μ L do corante e os tubos foram visualizados sob luz UV (figura 16A). Para confirmar a amplificação, estas mesmas reações foram aplicadas em gel de agarose a 1,5%, coradas com brometo de etídeo e visualizadas sob luz UV (figura 16B).

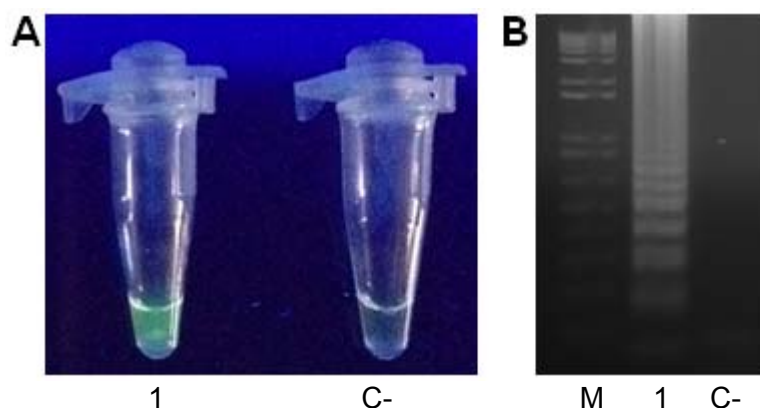


Figura 16: SYBR Green como método de visualização de resultados. Foram utilizados 1) 30 ng de DNA total de *A. aegypti* infectado por *wMel*. Após incubação, (A) 1 μ l de SYBR foi adicionado em cada tubo e foram visualizados sob luz UV (302 nm). Para confirmação, (B) o produto de cada tubo foi aplicado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo. M: Marcador de peso molecular 1kb plus; C-: controle negativo.

5.5 Diferença de custos entre PCR e LAMP

O uso da PCR para diagnóstico e detecção de diversos genes é uma das principais técnicas utilizadas, mas são técnicas que requerem equipamentos caros e um tempo elevado para sua execução.

Para confirmar se a metodologia LAMP tem um baixo custo em relação à PCR convencional, através do preço de catálogo de cada reagente, foi feito o cálculo de custo por reação, em reais, de ambas as técnicas. Somando os valores de cada reagente por reação, além dos reagentes utilizados para que seja feita a visualização do resultado e excluindo o valor dos equipamentos, a técnica LAMP apresentou um custo de 53,92% menor em relação à PCR convencional (tabelas 2 e 3). Quando incluímos o valor dos equipamentos para execução e visualização dos resultados, podemos concluir que o custo para realização da técnica LAMP é consideravelmente menor do que a reação de PCR.

Tabela 3: Relação dos custos, em reais, para execução da técnica de PCR convencional.

PCR CONVENCIONAL - Taq DNA Polimerase (Invitrogen)			
MATERIAL	PREÇO	PREÇO POR REAÇÃO (MÉDIA 10 µL/ TUBO em R\$)	Quantidade média por reação
Taq DNA polimerase Invitrogen (11615-010)	R\$ 280,00	2,50	2U a 5U
Tampão	R\$ 0,00	0,00	1 µL
MgCl ₂	R\$ 0,00	0,00	0,3 µL
Água para biologia molecular Sigma, 1 Litro	R\$ 155,00	0,01	4,2 µL
dNTP 200 µL	R\$ 106,00	0,53	1 µL
Oligo Foward (2 µM)	R\$ 40,00	0,07	1 µL
Oligo Reverse (2 µM)	R\$ 40,00	0,07	1 µL
Agarose	R\$ 300,00	3,00	1 g
Brometo de Etídeo	R\$ 160,00	0,08	5uL
Padrão de peso molecular	R\$ 693,00	0,13	4uL no gel
TOTAL		6,39	
EQUIPAMENTOS	PREÇO		
Termociclador	R\$ 20.000,00		
Cuba de eletroforese	R\$ 2.000,00		
Fonte	R\$ 1.500,00		
TOTAL	R\$ 23.500,00		

*Consulta de preços em janeiro de 2014.

Tabela 4: Relação dos custos, em reais, para execução da técnica LAMP.

LAMP - <i>Bst</i> DNA Polimerase (New England Biolabs)			
MATERIAL	PREÇO	PREÇO POR REAÇÃO (MÉDIA 25 µL/ TUBO em R\$)	Quantidade média por reação
F3 (10 µM)	R\$ 40,00	0,10	0,4 µL
B3 (10 µM)	R\$ 40,00	0,10	0,4 µL
LoopF (10 µM)	R\$ 40,00	0,20	0,8 µL
LoopR (10 µM)	R\$ 40,00	0,20	0,8 µL
FIP (10 µM)	R\$ 40,00	0,30	1,6 µL
BIP (10 µM)	R\$ 40,00	0,30	1,6 µL
Água para biologia molecular Sigma, 1 Litro	R\$ 155,00	0,02	11,5 µL
<i>Bst</i> DNA polimerase	R\$ 290,00	1,160	6,4U
Betaina	R\$ 95,00	0,203	3,2 µL
Hydroxy Naphtol Blue	R\$ 90,00	0,002	-
dNTP 200 µL	R\$ 106,00	0,430	0,8 µl
TOTAL		3,015	
EQUIPAMENTOS		PREÇO	
Termobloco (banho seco)		R\$ 1.500,00	
TOTAL		R\$ 1.500,00	

*Consulta de preços em janeiro de 2014.

6 DISCUSSÃO

Devido a grande importância epidemiológica das doenças transmitidas por vetores, há um grande esforço na busca de novas estratégias de controle destas doenças no mundo inteiro (McGraw & O'Neill, 2013).

O uso da bactéria *Wolbachia* como alternativa para controle de doenças tem se mostrado uma metodologia com resultados promissores para sua utilização em campo para controle da Dengue através do programa *Eliminate Dengue* (www.eliminatedengue.org). Para seu uso no campo e para que seja feito o monitoramento da disseminação da *Wolbachia*, é necessário o desenvolvimento de uma técnica específica, sensível, rápida e de baixo custo para detecção em larga escala da bactéria em insetos liberados em campo.

A técnica LAMP tem sido aplicada para diagnósticos de diversas doenças, como Dengue, Chikungunya e Hepatite A (Parida et al., 2005; Parida et al., 2007; Yoneyama et al., 2007) e também na detecção de diversos microorganismos, como *Plasmodium vivax* (Tao et al., 2011) e *Toxoplasma gondii* (Kong et al., 2012), além de bactérias semelhantes à *Wolbachia*, como *Anaplasma ovis* (Ma et al., 2011), *Ehrlichia ruminantum* (Nakao et al., 2010) e *Brucella* spp. (Song et al., 2012).

A metodologia de amplificação isothermal mediada por *loop* apresenta diversas vantagens para que seja feito o diagnóstico de doenças e microorganismos, dentre as quais: a rapidez na sua execução; fácil de ser realizada; maior eficiência de amplificação; visualização do resultado a olho nu; e apresenta custos mais baixos em relação à PCR, já que pode ser realizada utilizando apenas banho seco (Mori & Notomi, 2009; Nagamine et al., 2002; Yoneyama et al., 2007). Para a execução da PCR, é necessário o uso de termociclador para que ocorram os ciclos de amplificação, além do tempo gasto pós-amplificação para análise dos resultados (Parida et al., 2008).

A padronização da técnica foi estabelecida, com o tempo de incubação de 90 min para garantir amplificação de *Wolbachia* nos mais diversos hospedeiros, inclusive naqueles com baixa densidade da bactéria distribuída no corpo do inseto.

O LAMP é uma técnica bastante específica devido ao uso de 3 pares de *primers* que se ligam a 8 regiões distintas do gene 16S rRNA da bactéria *Wolbachia*. A inclusão dos *primers Loop* adicionais à reação reduziu o tempo de incubação necessário para que ocorresse a amplificação, como descrito por Nagamine e colaboradores (Nagamine et al., 2002).

Foi possível confirmar a especificidade utilizando amostras de DNA total de diferentes insetos infectados ou não pela bactéria, além de diferentes bactérias doadas por colaboradores. As reações de LAMP com insetos não infectados por *Wolbachia* demonstraram que não ocorrem amplificações do DNA das diferentes bactérias residentes do intestino de insetos, já que se utilizava o DNA total de cada amostra (Minard et al., 2013). Além disso, se mostrou uma metodologia sensível, sendo possível a amplificação a partir de uma cópia do DNA alvo da *Wolbachia* (Gonçalves et al., 2014).

Durante a execução do projeto, tivemos muitos problemas de contaminações, o que resultou em um tempo maior para padronização e obtenção dos resultados, já que a quantidade de DNA amplificado atinge a escala de 10^9 cópias (Notomi et al., 2000; Ushikubo, 2004; Parida et al., 2008). Khan e colaboradores executaram as reações de LAMP com os tubos envolvidos por parafilme como uma medida para evitar qualquer tipo de contaminação cruzada (Khan et al., 2012). Para evitar contaminações, principalmente aquelas causadas por aerossóis de *amplicons*, é importante que cada etapa de execução da reação seja realizada em salas separadas, utilizando EPI adequados e, preferencialmente, utilizar corantes para visualização de resultados que podem ser adicionados antes da reação, evitando a manipulação e liberação de produto amplificado no laboratório (Parida et al., 2008; Tao et al., 2011).

Utilizando o SYBR Green I como corante para visualização dos resultados, sob luz UV foi possível observar claramente a diferença entre os tubos positivo e negativo, após incubação da amostra através da técnica LAMP. Como descrito em outros trabalhos (Parida et al., 2008; Goto et al., 2009), é possível observar a diferença entre os positivos (verde) e negativos (laranja) à olho nu. Nas amostras testadas, no presente trabalho, não foi possível observar essa diferença, sendo necessária a utilização da luz UV, o que geraria um custo a mais para execução da técnica em campo. Devemos

levar em conta também o fato da necessidade de abertura dos tubos após a reação de LAMP, o que aumenta em muito o risco de contaminação por aerossóis.

Baseando-se nos cálculos dos reagentes do mercado brasileiro, na PCR convencional, há um gasto de R\$ 6,39 por reação, incluindo os reagentes para visualização dos resultados. Em contrapartida, para realização do LAMP, que requer apenas o uso de banho seco, há um gasto de R\$ 3,01, incluindo o reagente HNB para visualização dos resultados, sendo este valor 53,92% menor em relação à PCR. Em relação aos equipamentos, o gasto para realização do LAMP é 93,62% menor em relação aos equipamentos necessários para realização da PCR, o que confirma que a técnica LAMP é uma metodologia de baixo custo. Esse fato contribui para estudos de levantamento em larga escala e monitoramento de espécies infectadas por *Wolbachia*, no caso da aplicação prática dessa bactéria para controle de doenças transmitidas por mosquitos vetores.

Através deste trabalho, a amplificação isotermal LAMP se mostrou uma metodologia ideal para uso em larga escala na detecção de *Wolbachia*, já que a mesma apresenta características importantes para levantamento e monitoramento de insetos que albergam a bactéria, sendo rápida, específica, sensível e de baixo custo para sua execução em campo (Notomi et al., 2000; Gonçalves et al., 2014).

7 CONCLUSÃO

Através do aumento de estudos envolvendo *Wolbachia* e sua interação com insetos, além da grande quantidade de insetos que albergam a bactéria, é necessário o desenvolvimento de novas técnicas para sua detecção de forma rápida, com alta sensibilidade e especificidade.

Com o presente trabalho, concluímos que:

- ✓ Foi possível gerar *primers* específicos para *Wolbachia*;
- ✓ Foi confirmado o uso da técnica LAMP para detecção de *Wolbachia* diferentes espécies de hospedeiros, tanto em insetos de colônia, como de campo, através da visualização da amplificação em gel de agarose;
- ✓ A reação de LAMP pode ser utilizada para detecção de *Wolbachia* sem a necessidade do uso de equipamentos sofisticados, sendo possível sua realização em banho seco;
- ✓ A alta sensibilidade da técnica foi demonstrada através da amplificação de apenas 1 cópia da sequência alvo, tanto em termociclador, como em banho seco;
- ✓ A especificidade do LAMP foi confirmada através da não amplificação utilizando diferentes amostras de bactérias submetidas à técnica.
- ✓ O uso de diferentes corantes, como SYBR Green I e Azul de hidroxinaftol, são alternativas para visualização dos resultados sem o uso de gel de agarose.
- ✓ O LAMP se mostrou uma técnica rápida de ser realizada, bastante específica e com um baixo custo.

Através deste trabalho, poderemos ampliar a utilização da técnica para detecção de diferentes cepas de *Wolbachia*, já que foi observado que a técnica pode ser utilizada para detecção de SNPs (Badolo et al., 2012; Iwasaki et al., 2003; Nakamura et al., 2007), onde há apenas um nucleotídeo de diferença, confirmando a alta especificidade da técnica.

8 ANEXOS

SHORT REPORT

Open Access

Wolbachia detection in insects through LAMP: loop mediated isothermal amplification

Daniela da Silva Gonçalves¹, Anna Paula Alvim Cassimiro¹, Caroline Dantas de Oliveira¹, Nilton Barnabé Rodrigues² and Luciano Andrade Moreira^{1*}

Abstract

Background: The bacterium *Wolbachia* is a promising agent for the biological control of vector-borne diseases as some strains have the ability to block the transmission of key human disease-causing pathogens. Fast, accurate and inexpensive methods of differentiating between infected and uninfected insects will be of critical importance as field-based trials of *Wolbachia*-based bio-control become increasingly common.

Findings: We have developed a specific and sensitive method of detecting *Wolbachia* based on the isothermal DNA amplification. This technique can be performed in an ordinary heat block without the need for gel-based visualisation, and is effective for a wide variety of insect hosts.

Conclusion: Here we present the development of a rapid, highly sensitive and inexpensive method to detect *Wolbachia* in a variety of insect hosts, including key mosquito disease vectors.

Keywords: *Wolbachia*, LAMP-loop mediated isothermal amplification, Mosquito, Insect

Findings

Vector-borne diseases (e.g. malaria, dengue, filariases and Chagas disease) occur in more than 100 countries, primarily within the tropics, with the annual, global death rate in the millions. Despite the existence of a variety of vector control measures disease incidence is generally increasing, and consequently there is an urgent need to develop new and effective control strategies [1]. Ideally these strategies should be able to be used in conjunction with existing control methods, and in this context the bacterium *Wolbachia pipiensis* has proven to be a promising alternative, given its ability to restrict pathogen development in many different mosquito-pathogen combinations [2-5], and recently being applied in the field in Australia, Vietnam, Indonesia and soon in other dengue endemic countries (www.eliminatedengue.org).

Wolbachia is a vertically-transmitted bacterial endosymbiont of arthropods that is able to manipulate its host's reproductive system and consequently spread rapidly through wild populations [6]. *Wolbachia* was originally

identified in the ovaries of the mosquito *Culex pipiens* [7], and recent studies have estimated that 40% of terrestrial arthropod species are infected with the bacterium [8]. Critically, infections do not occur in key vector species including the dengue mosquito *Aedes aegypti* or in the *Anopheles* genus [9]. *Wolbachia* is typically detected within the host by PCR against genes such as *wsp* (*Wolbachia* surface protein) [10], *ftsZ* (cell division protein) [11], and 16S ribosomal protein [12], or through fluorescence-based assays [13]. These techniques can be expensive to perform for large numbers of samples, and require the use of laboratory equipment.

The LAMP (loop mediated isothermal amplification) technique utilizes *Bst* DNA polymerase to create strand-displacement amplification, and operates at a constant temperature [14]. Examples of its use are very broad, ranging from the detection of pathogenic microorganisms to sex determination in embryos [15]. The LAMP product can be detected by the visualisation of turbidity, fluorescence or a metal ion indicator producing a colorimetric change [16] without the need to run a gel. These characteristics make LAMP a suitable method to detect *Wolbachia* under circumstances where minimum infrastructure is available. Here we report the use of LAMP to detect

* Correspondence: luciano@cpqrr.fiocruz.br

¹Grupo Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno Vetor, Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

Wolbachia in a diverse range of insect species, which will prove beneficial to monitoring the progress of field-based trials utilising the bacterium.

Methods

We examined many different species including laboratory-reared mosquito lines of *Aedes fluviatilis*, naturally infected by the *Wolbachia* strain *wFlu*, *A. aegypti* transinfected with the *wMelPop* and *wMel* strains [17-19], and uninfected *Anopheles aquasalis* mosquitoes. These lines were reared at FIOCRUZ Minas as previously described [20]. We also examined field-captured mosquitoes including *A. aegypti*, *A. albopictus*, and *Culex sp.* Furthermore, insects belonging to a diverse range of orders, which were known to be *Wolbachia*-infected (unpublished results) were also included.

Specimens were stored in 96% ethanol until DNA extraction. Whole insect specimens were homogenized for 1.5 min using a Mini-Beadbeater-16 (BioSpec), in 1.5 mL tubes containing one 3 mm glass bead and 80 µl of homogenization buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl [pH 8.2]), and were then centrifuged at 4°C for 30s at 13,000 rpm [21]. The samples were then incubated at 97°C for 10 min, placed on ice for 15 min, and centrifuged for 10 min (4°C, 13,000 rpm). The supernatant was diluted 1:10. Primers for the *Wolbachia* 16S ribosomal sequence [12] were designed using the LAMP Designer 1.02 software (PREMIER Biosoft International) (Table 1).

Each LAMP reaction ($V_{total} = 25 \mu\text{l}$) contained 1× ThermoPol Reaction Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0.1% Triton X-100), 0.32 mM of each dNTP, 0.64 µM of each internal primer (FIP/BIP), 0.32 µM of LoopF and LoopB, 0.16 µM of each external primer (F3/B3), 0.64 M of Betaine, 6U of *Bst* DNA polymerase, large fragment (New England Biolabs), and approximately 30 ng of DNA. 1.2 mM of the metal ion indicator Hydroxy Naphthol Blue (HNB) was added to the ThermoPol Reaction Buffer. The mixture was incubated at 63°C for 90 minutes on a thermocycler or heat block, to determine if the reaction

could be performed with a simpler setup. To check the sensitivity of the assay we cloned the external primer amplicon (F3/B3) into the pGemT-Easy (Promega) plasmid, and observed the efficacy of the assay on serial dilutions of the product.

Results and discussion

Loop mediated isothermal amplification has been used to detect different organisms, such as *Leishmania* [22], *Toxoplasma gondii* [23] and also bacteria belonging to the same class as *Wolbachia* (Alphaproteobacteria); *Brucella spp* [24], *Anaplasma ovis* [25] and *Ehrlichia ruminantium* [26]. We designed a LAMP-based assay to detect *Wolbachia* in different hosts using the bacterial 16S rRNA sequence [12]. Initially we designed the four basic LAMP primers (F3, B3, FIP and BIP) but due to low specificity we then included the extra Loop primers [14].

To optimize the LAMP reaction for *Wolbachia*, samples of *A. fluviatilis* and *wMel*-infected *A. aegypti* were used to conduct a time course assay where we determined that

Table 1 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primers based on *Wolbachia* 16S sequences, designed using LAMP designer 1.02 software

Primer	Sequence (5'-3')
F3	CTCGTGTCGTGAGATGTTG
B3	GAACGTATTACACCGTGCC
FIP	CCCCTCCATAAGGGCCATGAGGGACTTTAAGGAAACTGCC
BIP	CAATGGTGGCTACAATGGGCTGGCAGAGTACAATCCGAACTG
LoopF	CCACCTTCCTCCAGTTTATCAC
LoopB	CGCCAGGCTAAGCTAATCC

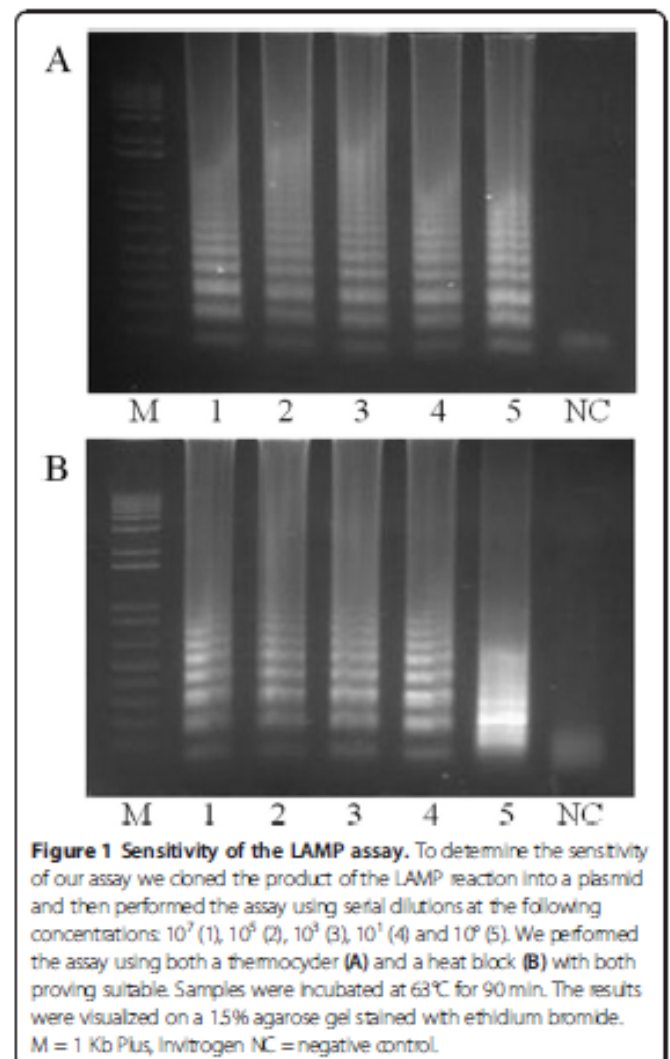


Figure 1 Sensitivity of the LAMP assay. To determine the sensitivity of our assay we cloned the product of the LAMP reaction into a plasmid and then performed the assay using serial dilutions at the following concentrations: 10^7 (1), 10^6 (2), 10^5 (3), 10^4 (4) and 10^3 (5). We performed the assay using both a thermocycler (A) and a heat block (B) with both proving suitable. Samples were incubated at 63°C for 90 min. The results were visualized on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. M = 1 Kb Plus, Invitrogen NC = negative control.

amplification first occurred after 60 minutes of incubation (at 63°C using a thermocycler – Additional file 1). This was subsequently standardized at 90 minutes in order to account for samples with low bacterial density.

Assay sensitivity was assessed by serially diluting plasmid DNA containing the target sequence. Dilutions containing 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^1 and 10^0 copies of the target gene were incubated for 90 min, using a thermocycler (Figure 1A) or heat block (Figure 1B). Sensitivity was high using either method, with amplification observed from as little as 10^0 copies of the target sequence, although it should be noted that amplification from plasmids is more effective than from genomic DNA.

To check the specificity of our assay we analyzed mosquito specimens (Diptera: *Culicidae*) both infected and uninfected with *Wolbachia*. No amplification was observed in uninfected specimens, suggesting that the assay was highly specific and did not react to other bacteria infecting the mosquito gut [27]. We were also correctly able to identify *Wolbachia* infection in insect specimens from

other orders (Figure 2B). It is important to mention though, as lateral gene transfer events are quite common in *Wolbachia* [28] further confirmation of the presence of this bacterium (MLST strain typing or in situ hybridization for instance) will likely be appropriate in specific studies, where the high throughput screening for positive individuals is not the main objective.

The assay included the metal ion indicator Hydroxy Naphthol Blue [16] (which reacts with the pyrophosphate ion by-product of the reaction) to check whether we could detect *Wolbachia* without running agarose gels. We were able to clearly visualise a difference in colour after incubating the samples of *A. fluviatilis* (infected with *w*Flu) and *A. aegypti* (wild type and infected with *w*Mel), besides the negative *A. aquasalis*, for 150 min at 63°C in the thermocycler (Figure 3). This step could be utilized when access to laboratory equipment is limited and also has an advantage of reducing the risk of contamination (no need to open the tubes).

In terms of the cost per reaction, LAMP is approximately half as expensive as conventional PCR. If the cost of equipment is also included, LAMP becomes comparatively even cheaper given that it can be performed using only a heat block. As a further cost-saving measure, or if required in the field, homogenization of specimens could be performed using micro-pestles rather than a beadbeater.

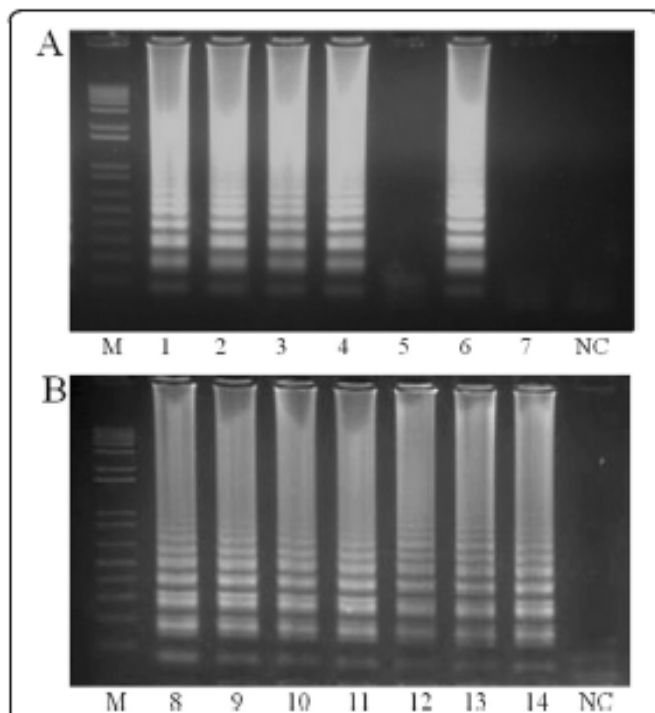


Figure 2 Specificity and reliability of the LAMP assay in different insects. To determine the specificity and reliability of our assay we amplified the DNA from different mosquito species (Diptera), including those naturally infected with *Wolbachia* (A) *Ae. albopictus* (1), *Ae. fluviatilis* (2), *Culex* sp. (6) those with transinfections; *Ae. aegypti* – *w*Mel (3), *Ae. aegypti* – *w*MelPop (4), and those with no infection; *Ae. aegypti* (5), *An. aquasalis* (7). We also examined insects from a range of different orders that were known to be infected with *Wolbachia* (B) Hymenoptera (8), Hemiptera (9), Lepidoptera (10), Orthoptera (11), Siphonaptera (12), Coleoptera (13), Isoptera (14). M = 1 Kb Plus, Invitrogen. NC = negative control. All *Wolbachia*-infected specimens amplified, while no amplification was observed for uninfected specimens indicating that the assay was both highly reliable and highly specific.

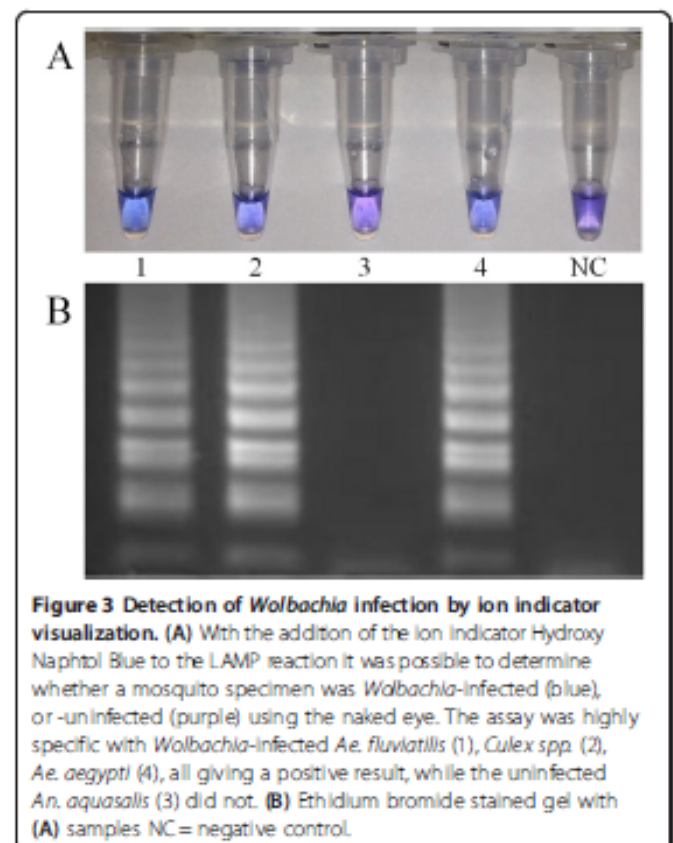


Figure 3 Detection of *Wolbachia* infection by ion indicator visualization. (A) With the addition of the ion indicator Hydroxy Naphthol Blue to the LAMP reaction it was possible to determine whether a mosquito specimen was *Wolbachia*-infected (blue), or -uninfected (purple) using the naked eye. The assay was highly specific with *Wolbachia*-infected *Ae. fluviatilis* (1), *Culex* spp. (2), *Ae. aegypti* (4), all giving a positive result, while the uninfected *An. aquasalis* (3) did not. (B) Ethidium bromide stained gel with (A) samples NC = negative control.

We have demonstrated the reliability and sensitivity of using LAMP to detect *Wolbachia*, with detection possible for low-density infections, and the results easily visualized by the naked eye. Consequently, this technique could be readily applied in the field, without the need to use expensive laboratory equipment. This is the first report of the use of LAMP to detect *Wolbachia* infection in different hosts. The technique could potentially be applied to differentiating between multiple strains that could potentially occur within the same host species.

Additional file

Additional file 1: Standardization of the LAMP assay incubation time.

To determine the optimal incubation time for the assay, LAMP reactions were performed using (1) *Ae. fluviatilis* naturally infected with *Wolbachia* (wFlu), and (2) *Ae. aegypti* artificially infected with wMel. Samples were incubated at 63°C in a thermocycler and the tubes were removed at different times: 30 min (a), 60 min (b), 90 min (c), 120 min (d), 150 min (e). The products were visualised on a 1.5% agarose gel stained with EtBr. Visible products were present after 60 minutes of incubation. NC = negative control.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

DSG participated in the design of the study, carried out all experiments and drafted the manuscript. APAC helped to conduct the experiments. CDO collected and screened infected insects. NBR and LAM participated on the study design. LAM coordinated the work, critically reviewed the manuscript and contributed to obtaining the results. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We thank Constança Ayres for providing mosquito samples. We are in debt to Fernanda Rezende for technical and Alice Guimarães for administrative support, as well as Eric P. Caragata for critical reading. DS Gonçalves and LA Moreira are CNPq fellows. NBR is a CAPES fellow (BEX 11603/13-5).

Financial support

This work was supported by FAPEMIG, CNPq, the Brazilian Ministry of Health (DECIT/SVS), and a grant to Monash University from the Foundations for the National Institutes of Health through the Vector-Based Transmission of Control: Discovery Research (VCTR) program of the Grand Challenges in Global Health Initiatives of the Bill and Melinda Gates Foundations.

Author details

¹Grupo Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno Vetor, Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil. ²Entomologia Médica, Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil.

Received: 25 March 2014 Accepted: 6 May 2014
Published: 19 May 2014

References

1. McGraw EA, O'Neill SL: Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nat Rev Microbiol* 2013, **11**:181-193.
2. Kambris Z, Cook PE, Phuc HK, Sinkins SP: Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science* 2009, **326**(80):134-136.
3. Bian G, Xu Y, Lu P, Xie Y, Xi Z: The Endosymbiotic Bacterium *Wolbachia* induces resistance to Dengue Virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* 2010, **6**:e1000833.

4. Glaser RL, Meola MAC-F: The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection. *PLoS One* 2010, **5**:e11977.
5. Bian G, Joshi D, Dong Y, Lu P, Zhou G, Pan X, Xu Y, Dimopoulos G, Xi Z: *Wolbachia* invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to *Plasmodium* infection. *Science* 2013, **340**(80):748-751.
6. Werren JH, Baldo L, Clark ME: *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol* 2008, **6**:741-751.
7. Herzig M, Wolbach SB: Studies on *Rickettsia*-like micro-organisms in insects *. *J Med Res* 1924, **4**:329-3747.
8. Zug R, Hammestein P: Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PLoS One* 2012, **7**:e38544.
9. Kittayapong P, Baisley KJ, Baimai V, O'Neill SL: Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 2000, **37**:340-345.
10. Zhou W, Rousset F, O'Neill S: Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc Biol Sci* 1998, **265**:509-515.
11. Werren JH, Zhang W, Guo LR: Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc Biol Sci* 1995, **261**:55-63.
12. Simoes P, Mialdea G, Reiss D, Sagot F, Charlat S: *Wolbachia* detection: an assessment of standard PCR Protocols. *Mol Ecol Resour* 2011, **11**:567-572.
13. Casper-Lindley C, Kimura S, Saxton DS, Essav Y, Simpson I, Tan V, Sullivan W: Rapid fluorescence-based screening for *Wolbachia* endosymbionts in *Drosophila* germ line and somatic tissues. *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**:4788-4794.
14. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000, **28**:e63.
15. Fu S, Qu G, Guo S, Ma L, Zhang N, Zhang S, Gao SSZ: Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification. *Appl Biochem Biotechnol* 2011, **163**:845-850.
16. 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, **46**:167-172.
17. Moreira LA, Iturbe-Gomara I, Jeffrey JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LF, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, Van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL: A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 2009, **139**:1268-1278.
18. McMeniman CJ, Lane AM, Fong AW, Voronin DA, Iturbe-Gomara I, Yamada R, McGraw EA, O'Neill SL: Host adaptation of a *Wolbachia* strain after long-term serial passage in mosquito cell lines. *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:6963-6969.
19. Walker T, Moreira LA: Can *Wolbachia* be used to control malaria? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011, **106**:212-217.
20. Baton LA, Pacidônio EC, Gonçalves DDS, Moreira LA: wFlu characterization and evaluation of a native *Wolbachia* from the mosquito *Aedes fluviatilis* as a potential vector control agent. *PLoS One* 2013, **8**:e59619.
21. Fu Y, Gavotte L, Mercer DR, Dobson SL: Artificial triple *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* yields a new pattern of unidirectional cytoplasmic incompatibility. *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**:5887-5891.
22. Khan MGM, Bhaskar KRH, Salam MA, Akther T, Pluschke G, Mondal D: Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. *Parasites & Vectors* 2012, **5**:280.
23. Kong QM, Lu SH, Tong QB, Lou D, Chen R, Zheng B, Kumagai T, Wen LY, Ohta N, Zhou XN: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): early detection of *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasites & Vectors* 2012, **5**:2.
24. Song L, Li J, Hou S, Li X, Chen S: Establishment of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Brucella* spp. and application to milk and blood samples. *J Microbiol Methods* 2012, **90**:292-297.
25. Ma M, Liu Z, Sun M, Yang J, Guan G, Li Y, Luo J, Yin H: Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Anaplasma ovis*. *J Clin Microbiol* 2011, **49**:2143-2146.
26. Nakao R, Stromdahl EY, Magona JW, Faburay B, Namangala B, Malele I, Inoue N, Geysen D, Kajino K, Jongejans F, Sugimoto C: Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection of *Ehrlichia ruminantium*. *BMC Microbiol* 2010, **10**:296.

27. Minard G, Mavingui P, Moro CV: Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit Vectors* 2013, **6**:1-46.
28. Dunning Hotopp JC, Clark ME, Oliveira DCSG, Foster JM, Fischer P, Muñoz-Torres MC, Gebel JD, Kumar N, Ishmael N, Wang S, Ingram J, Nene RV, Shepard J, Tomkins J, Richards S, Spiro DJ, Ghedin E, Slatko BE, Tettelin H, Weiren JH: Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science* 2007, **317**:1753-1756.

doi:10.1186/1756-3305-7-228

Cite this article as: Gonçalves et al: *Wolbachia* detection in insects through LAMP: loop mediated isothermal amplification. *Parasites & Vectors* 2014 **7**:228.

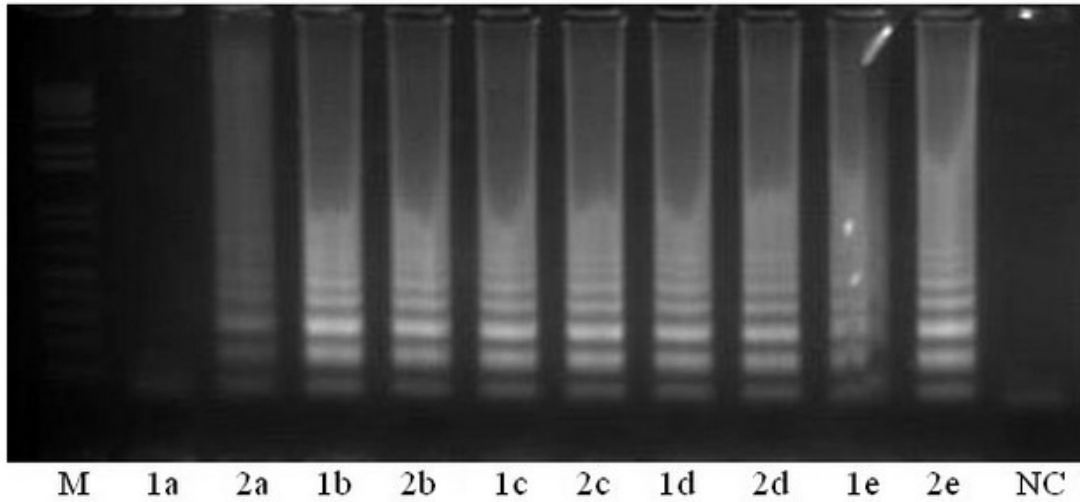
**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Additional file 1:



Standardization of the LAMP assay incubation time. To determine the optimal incubation time for the assay, LAMP reactions were performed using; (1) *Ae. fluviatilis* naturally infected with *Wolbachia* (*wFlu*), and (2) *Ae. aegypti* artificially infected with *wMel*. Samples were incubated at 63°C in a thermocycler and the tubes were removed at different times: 30 min (a), 60 min (b), 90 min (c), 120 min (d), 150 min (e). The products were visualised on a 1.5% agarose gel stained with EtBr. Visible products were present after 60 minutes of incubation. NC = negative control.

Nova estratégia de combate à dengue

Wolbachia

Doença de grande importância para a saúde pública, a dengue infecta cerca de 390 milhões de pessoas por ano no mundo. Como ainda não existe um tratamento específico ou uma vacina, a principal medida adotada contra a doença é o controle do mosquito que a transmite, o *Aedes aegypti*. Na busca de estratégias alternativas para evitar novos surtos e epidemias, descobriu-se que a capacidade de transmissão do vírus da dengue é significativamente reduzida quando mosquitos *Aedes* têm em seu organismo a bactéria *Wolbachia*.

O uso desse micro-organismo – já há estudos nesse sentido no Brasil – poderá reduzir a disseminação da doença.

Daniela da Silva Gonçalves e Luciano A. Moreira
Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (MG)



achia

A dengue, doença responsável pelo maior número de hospitalizações no mundo atual, é causada pelo vírus DENV, que tem cinco tipos diferentes (sorotipos) – o quinto, descoberto na Malásia em outubro, ainda exigirá maiores estudos. A Organização Mundial da Saúde estima que cerca de 100 milhões de pessoas contraem a doença por ano, no mundo, mas estudos indicam que esse número pode ser até quatro vezes maior. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção, nas regiões tropicais e subtropicais (ver ‘Três formas diferentes’).

O vírus é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente da espécie *Aedes aegypti*, hoje presente em áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo. A transmissão ocorre quando uma fêmea do inseto se alimenta de sangue (importante para a maturação de seus ovos) em uma pessoa que esteja na fase aguda (inicial) da doença. Com o sangue, o mosquito ingere o vírus, que se desenvolve em seu organismo e, após cerca de 10 dias, pode ser injetado em outro indivíduo picado pelo inseto, fechando o ciclo de transmissão.

Acredita-se que a dengue surgiu no Sudeste Asiático, de onde aos poucos se espalhou pelo mundo. Em 1780

aconteceram, na América do Norte e na África, os primeiros surtos atribuídos à doença fora da Ásia, e a primeira epidemia de dengue hemorrágica ocorreu em 1953 nas Filipinas. No Brasil, além de prováveis surtos no século 19, a doença causou epidemias em São Paulo, em 1916, e em Niterói (RJ), em 1923, mas as campanhas de combate aos mosquitos transmissores da febre amarela também eliminaram o *Aedes* do país por várias décadas. A dengue retornou nos anos 1980, com epidemias em Roraima (1982) e depois em algumas capitais nordestinas (Maceió, Fortaleza e Recife) e no Rio de Janeiro (1986-1987). A partir daí, espalhou-se por praticamente todo o território nacional.

Segundo dados do Sistema de Vigilância Epidemiológica da Dengue, entre 2000 e 2012 foram registrados no território brasileiro pouco mais de 5,8 milhões de casos de dengue. Foram confirmados, no mesmo período, 22.501 casos da forma grave (com 1.533 mortes) e 69.415 da forma ‘com complicações’ (com 1.639 mortes). As maiores epidemias aconteceram em 2002, 2008 e 2010. Neste ano, somente no primeiro semestre, foram notificados cerca de 1,47 milhão de casos de dengue no Brasil, com mais de 500 mortes.

>>>

Bactéria contra vírus O combate ao *A. aegypti*, com inseticidas e campanhas de prevenção que visam reduzir a infestação de mosquitos, é a principal estratégia adotada atualmente contra a dengue. Mas equipes de pesquisa em todo o mundo tentam encontrar outras formas de controlar a doença, para reduzir o número de infectados e de casos graves que exigem internação, o que, além de evitar mortes desnecessárias, diminuiria o custo social e financeiro dos surtos, que são mais intensos no período de chuvas, entre março e junho. Há mais de 30 anos tenta-se criar uma vacina que imunize as populações humanas, protegendo-as dos diversos sorotipos, mas muitos ‘candidatos’ a vacina falharam e os ainda em estudo dependem de testes de campo.

Há alguns anos, porém, surgiu uma alternativa de controle biológico da dengue. Cientistas que estudavam bactérias do gênero *Wolbachia* – presentes em cerca de 60% dos insetos do mundo – descobriram que ela é capaz de impedir a transmissão do DENV, ao afetar o desenvolvimento normal do vírus no organismo dos insetos, gerando uma estratégia promissora de combate à doença. A *Wolbachia* é transmitida apenas das fêmeas para seus descendentes e só vive dentro das células dos insetos hospedeiros. Essa bactéria, nunca encontrada em vertebrados, é inofensiva a animais e seres humanos.

O mosquito *A. aegypti*, porém, não é naturalmente infectado pela bactéria. Para que isso ocorresse, pesquisadores da Universidade de Monash, na Austrália, isolaram linhagens de *Wolbachia* da mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*), cultivaram a bactéria em cé-

TRÊS FORMAS DIFERENTES

A dengue é uma doença viral que tem como sintomas iniciais febre alta, dor de cabeça, dor em músculos e juntas, manchas vermelhas na pele e prostração – vômitos e diarreia também podem ocorrer, especialmente em crianças. Na maioria dos casos, os sintomas duram cerca de uma semana e desaparecem sem sequelas: é a dengue clássica. Mas há outras duas formas da doença que exigem maiores cuidados: a dengue grave (nome recomendado, em lugar de dengue hemorrágica, já que em muitos casos graves não há hemorragia) e a dengue com complicações.

Na forma grave, podem ocorrer sangramentos espontâneos em certas mucosas (nariz, gengiva e outras) e hematomas decorrentes do rompimento de vasos sanguíneos na pele. Em casos severos, pode haver hemorragia nos aparelhos digestivo e urinário, queda acentuada da quantidade de plaquetas (células responsáveis pela coagulação do sangue) e variações na pressão sanguínea, quadro que pode levar o paciente à morte, se não receber tratamento. A forma com complicações inclui alterações neurológicas, cardiopulmonares, hepáticas e outras, e também pode ser fatal.



Figura 1. Número de casos de dengue no Brasil entre 2000 e 2012, segundo o Portal da Saúde, do Ministério da Saúde, mostrando picos em 2002, 2008 e 2010 e, em vermelho, o número de mortes

lulas desse mosquito e, após milhares de microinjeções nos ovos do inseto, conseguiram que a infecção se tornasse estável em populações do *Aedes*. Nos hospedeiros, a bactéria invade e coloniza diversos tecidos, como glândulas salivares, intestino, músculos torácicos e órgãos reprodutivos, e esse último passo é essencial para que seja transmitida aos descendentes do inseto infectado.

Assim que a bactéria se estabeleceu no *A. aegypti*, observou-se que ela era capaz de reduzir a replicação do vírus da dengue nos tecidos do inseto e bloquear sua transmissão. Esses efeitos decorrem possivelmente do aumento da imunidade que a bactéria induz no mosquito e também da competição por nutrientes celulares, já que ambos – vírus e bactéria – vivem dentro das células.

Além disso, a *Wolbachia* induz nos hospedeiros uma anormalidade reprodutiva chamada tecnicamente de ‘incompatibilidade citoplasmática’. As fêmeas do mosquito infectadas geram ovos férteis quando copulam tanto com machos infectados quanto com não infectados, transmitindo a bactéria aos descendentes, mas, devido a essa anormalidade, o cruzamento de fêmeas não infectadas com machos infectados leva ao bloqueio total ou parcial do número de ovos férteis. Com isso, as fêmeas com *Wolbachia* têm mais chance de deixar descendentes, o que favorece a disseminação da bactéria na população de mosquitos.

O real mecanismo envolvido na incompatibilidade citoplasmática ainda não foi elucidado, mas sugere-se que a bactéria modifica o espermatozoide do hospedeiro, o que impede o desenvolvimento dos embriões. Essa anormalidade é um fator importante para garantir sucesso no controle da dengue, já que a bactéria promove a própria propagação no ambiente e, com o tempo, 100% dos mosquitos estarão infectados, reduzindo ou eliminando a transmissão do vírus DENV.



Figura 2. A presença da *Wolbachia* causa nos insetos uma anormalidade reprodutiva, a incompatibilidade citoplasmática: o cruzamento de machos infectados e fêmeas sem a bactéria não gera descendentes, mas o de fêmeas infectadas (e machos com ou sem a bactéria) gera embriões viáveis e infectados, o que aumenta rapidamente a população de insetos com *Wolbachia*.



Eliminar a dengue O projeto de uso da *Wolbachia* para tentar reduzir os casos de dengue teve início na Austrália e se expandiu para Indonésia, China e Vietnã. Na Austrália e no Vietnã, já aconteceram as liberações de linhagens de *A. aegypti* com a bactéria. No Brasil, a primeira liberação dos mosquitos infectados está programada para este ano, em algumas localidades do estado do Rio de Janeiro.

Na Austrália, já foram realizadas solturas em sete localidades no norte do país, e estudos confirmaram que a infecção se espalha rapidamente pela população de mosquitos. Verificou-se, por exemplo, que após 10 semanas de soltura (em 2011, em duas localidades) a proporção de mosquitos com a *Wolbachia* foi bem próxima dos 100%, e até hoje se mantém alta, revelando que a bactéria se estabeleceu com sucesso. O próximo passo será mostrar que essa estratégia pode reduzir o número de casos da doença. Para isso, porém, é preciso realizar testes em países onde a dengue é endêmica.

No Brasil, o projeto 'Eliminar a Dengue: Desafio Brasil' está em fase inicial. Estão sendo feitos cruzamentos entre os insetos para que a *Wolbachia* seja transmitida para linhagens de *A. aegypti* que tenham a carga genética da população desses insetos existente no país. Também vêm sendo realizados testes, em laboratório, para confirmar se a *Wolbachia* também é capaz de bloquear os vírus da dengue que circulam no território brasileiro.

A adoção dessa nova estratégia de combate, no entanto, não significa que a população pode abandonar as atividades – bastante eficazes – de controle dos mosquitos (como eliminar criadouros, ou seja, depósitos de água parada ao ar livre e outros). A inspeção frequente das moradias deve continuar mesmo após a introdução da *Wolbachia* em uma localidade.

Está em andamento o processo de escolha das primeiras localidades (Urca, Tubiacanga, Vila Valqueire e

Jurujuba, no estado do Rio de Janeiro) em que ocorrerão as liberações e vêm sendo definidas as ações necessárias para levar informações detalhadas sobre o projeto aos moradores, para maior adesão e contribuição às medidas de controle. Em paralelo, está sendo feito um reconhecimento minucioso da população nativa do *A. aegypti*, visando evitar que o número de mosquitos aumente consideravelmente nas áreas onde ocorrerem as solturas.

As populações de mosquitos também serão monitoradas após a liberação das linhagens infectadas, para verificar se a bactéria se propagou e se estabeleceu no ambiente. Em seguida, será avaliado o efeito da bactéria na capacidade de bloqueio ao vírus da dengue. Com base nos resultados já obtidos nos países onde esses mosquitos foram liberados, esperam-se resultados positivos, com a disseminação da *Wolbachia* nas populações de mosquitos no Brasil e, no futuro, a redução considerável de casos de dengue e possivelmente das mortes causadas por essa doença. **11**

Sugestões para leitura

MOREIRA, L. A.; O'NEILL, S. L. e outros. 'A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya, and Plasmodium', em *Cell*, v. 139, p. 1.268, 2009.

WERREN, J. H.; BALDO, L. e CLARK, M. E. '*Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology', em *Nature Reviews*, v. 6, p. 741, 2008.

NA INTERNET

OLIVEIRA, C. D. e MOREIRA, L. A. 'Uso de *Wolbachia* no controle biológico', em SILVA-NETO, M. A. C.; WINTER, C. e TERMIGNONI, C. (orgs.), *Tópicos avançados em entomologia molecular*. Rio de Janeiro, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012. Disponível em www.inctem.bioqmed.ufrrj.br/biblioteca/arthrolivro-1/capitulo-19-uso-de-wolbachia-no-controle-biologico/view.

Bulletin of Entomological Research

Broader prevalence of Wolbachia in insects including potential human disease vectors --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Broader prevalence of Wolbachia in insects including potential human disease vectors
Article Type:	Full research paper
Keywords:	Wolbachia; insect; endosymbiont; diversity; disease vectors
Corresponding Author:	Luciano Moreira, Ph.D. Centro de Pesquisas René Rachou Belo Horizonte, Minas Gerais BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Centro de Pesquisas René Rachou
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Caroline Oliveira
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Caroline Oliveira Daniela Gonçalves Luke Baton Paloma Shimabukuro Fabiano Carvalho Luciano Moreira, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>Wolbachia are intracellular, maternally-transmitted bacteria considered the most abundant endosymbiont found in arthropods. They reproductively manipulate their host in order to increase their chances of being transmitted to the offspring, and currently are being used as a tool to control vector-borne diseases. Studies on the distribution of Wolbachia among its arthropod hosts are important both for better understanding the mechanism of why this bacterium is so common, as well as for its potential use as a biological control agent.</p> <p>Here, we studied the incidence of Wolbachia in a broad range of insect species, collected from different regions of Brazil, using three genetic markers (16S rRNA, wsp, and ftsZ), which varied in terms of their sensitivity to detect this bacterium.</p> <p>The overall incidence of Wolbachia among species was 63.4% belonging to 58 families and 14 orders. The most common positive insect orders were Coleoptera, Diptera, Hemiptera and Hymenoptera, whereas Diptera and Hemiptera had the highest numbers of Wolbachia positive families. Wolbachia positive insects included important human disease vectors, which infection status has never been reported before. Our study further shows the importance of using quantitative PCR (qPCR) for a high-throughput and sensitive Wolbachia screening.</p>

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arakaki N, Miyoshi T, Noda H. *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Franklinothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta). *Proc R Soc Lond B*, 2001; 286(1471): 1011–1016.
- Badolo A, Okado K, Guelbeogo WM, Aonuma H, Bando H, Fukumoto S, Kanuka H. Development of an allele-specific, loop-mediated, isothermal amplification method (AS-LAMP) to detect the L1014F *kdr-w* mutation in *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 2012; 11(1): 227.
- Baldini F, Segat N, Pompon J, Marcenac P, Robert Shaw W, Dabiré RK, Catteruccia F. Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. *Nature Communications*, 2014; 5(3985).
- Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Werren JH. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006; 72(11): 7098–7110.
- Baldo L, Werren, JH. Revisiting *Wolbachia* Supergroup Typing Based on *WSP*: Spurious Lineages and Discordance with MLST. *Curr Microbiol*, 2007; 55(1): 81–87.
- Bandi C, Anderson TJ, Genchi C, Blaxter MLC-P. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc Biol Sci*, 1998; 265: 2407–2413.
- Bandi C, Trees AJ, Brattig NW. *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. *Veterinary Parasitology*, 2001; 98(1-3): 215–238.
- Baton LA, Pacidônio EC, Gonçalves DS, Moreira LA. *wFlu*: characterization and evaluation of a native *Wolbachia* from the mosquito *Aedes fluviatilis* as a potential vector control agent. *PloS One*, 2013; 8(3): e59619.
- Bian G, Joshi D, Dong Y, Lu P, Zhou G, Pan X, Xu Y, Dimopoulos G, Xi Z. *Wolbachia* invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to *Plasmodium* infection. *Science*, 2013; 340: 748–751.
- Breeuwer JA, Jacobs G. *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. *Exp Appl Acarol*, 1996; 20: 421–434.
- Casiraghi M, Bordenstein SR, Baldo L, Lo N, Beninati T, Wernegreen JJ, Werren, JH, Bandi C. Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology*, 2005; 151: 4015–4022.

Cook PE, McMeniman CJ, O'Neill SL. Modifying insect population age structure to control vector-borne disease. *Adv Exp Med Biol*, 2008; 627: 126-40.

Dobson SL, Bourtzis K, Braig HR, Jones BF, Zhou W, Rousset F, O'Neill SL. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem Mol Biol*, 1999; 29: 153-160.

Duploux A, Hurst GDD, O'Neill SL, Charlat S. Rapid spread of male-killing *Wolbachia* in the butterfly *Hypolimnas bolina*. *J Evol Biol*, 2010; 23(1): 231-235.

Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Usui C, Nishiyama Y. Rapid diagnosis of Herpes Simplex virus infection by a loop-mediated Isothermal Amplification Method. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005; 43(2): 951-955.

Fu Y, Gavotte L, Mercer DR, Dobson SL. Artificial triple *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* yields a new pattern of unidirectional cytoplasmic incompatibility. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010; 76(17): 5887-5891.

Fujino M, Yoshida N, Yamaguchi S, Hosaka N, Ota Y, Notomi F. A simple method for the detection of measles virus genome by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Journal of Medical Virology*, 2005; 76: 406-413.

Glaser RL, Meola MAC-P. The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection. *PLoS One*, 2010; 5: e11977.

Gonçalves DS, Cassimiro APA, de Oliveira CD, Rodrigues NB, Moreira LA. *Wolbachia* detection in insects through LAMP: loop mediated isothermal amplification. *Parasites & Vectors*, 2014; 7(1): 228.

Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki KI. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques*, 2009; 46(3): 167-172.

Gottlieb Y, Zchori-Fein E, Werren JH, Karr TL. Diploidy restoration in *Wolbachia*-infected *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). *J Invertebr Pathol*, 2002; 81: 166-174.

Hertig M. The Rickettsia, *Wolbachia pipientis* (Gen. Et SP.N.) and Associated Inclusions of the Mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology*, 1936; 28(4): 453-486.

Hertig M, Wolbach SB. Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects*. *The Journal of Medical Research*, 1924; 44(3): 329-374.

Hoffmann AA, Turelli M. Unidirectional Incompatibility in *Drosophila simulans*: Inheritance, Geographic Variation and Fitness Effects. *Genetics Society of America*, 1988; (199): 435-444.

Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, O'Neill SL. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*, 2011; 476(7361): 454–457.

Hurst GDD, Jiggins FM, Schulenburg JHGVD, Bertrand D, West SA, Goriacheva II, Zakharov IA, Werren JH, Stouthamer R, Majerus MEN. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proc R Soc Lond B*, 1999; 266: 735–740.

Irving-Bell RJ. Cytoplasmic factors in the gonads of *Culex pipiens* complex mosquitoes. *Life Sciences*, 1974; 14(6): 1149–1151.

Iturbe-Ormaetxe I, Walker T, O'Neill SL. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Reports*, 2011; 12(6): 508–518.

Iwasaki M, Yonekawa T, Otsuka K, Suzuki W, Negamine K, Hase T, Horigome T. Validation of the loop-mediated isothermal amplification method for single nucleotide polymorphism genotyping with whole blood. *Genome Letters*, 2003; 2: 119–126.

Jin C, Ren X, Rasgon JL. The virulent *Wolbachia* strain wMelPop efficiently establishes somatic infections in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2009; 75: 3373–3376.

Kambris Z, Blagborough AM, Pinto SB, Blagrove MS, Godfray HC, Sinden RE, Sinkins SP. *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits *Plasmodium* development in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog*, 2010; 6: e1001143.

Khan MGM, Bhaskar KRH, Salam MA, Akther T, Pluschke G, Mondal D. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. *Parasites & Vectors*, 2012; 5(1): 280.

Knipling E. Possibilities of insect control or eradication through use of sexually sterile males. *J Med Entomol*, 1955; 48: 459–462.

Kong QM, Lu SH, Tong QB, Lou D, Chen R, Zheng B, Kumagai T, Wen L, Ohta N, Zhou X. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): early detection of *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasites & Vectors*, 2012; 5(1): 2.

Lee SS, Baker RE, Gaffney EA, White SM. Modelling *Aedes aegypti* mosquito control via transgenic and sterile insect techniques: endemics and emerging outbreaks. *Journal of Theoretical Biology*, 2013; 331: 78-90.

Lo N, Casiraghi M, Salati E, Bazzocchi C, Bandi C. How many *Wolbachia* supergroups exist? *Mol Biol Evol*, 2002; 19(3): 341–46.

Ma M, Liu Z, Sun M, Yang J, Guan G, Li Y, Luo J, Yin H. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Anaplasma ovis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011; 49(6): 2143–2146.

Maciel-de-Freitas R, Aguiar R, Bruno RV, Guimarães MC, Lourenço-de-Oliveira R, Sorgine MHF, Moreira LA. Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in Latin America? *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 2012; 107(6): 828–829.

McGraw EA, O'Neill SL. *Wolbachia pipientis*: intracellular infection and pathogenesis in *Drosophila*. *Current Opinion in Microbiology*, 2004; 7(1): 67–70.

McGraw EA, O'Neill SL. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature Reviews. Microbiology*, 2013; 11(3): 181–193.

McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AW, Sidhu M, Wang YF, O'Neill SL. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 2009; 323: 141–144.

Minard G, Mavingui P, Moro CV. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & Vectors*, 2013; 6(1): 146.

Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, O'Neill SL. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*, 2009; 139(7): 1268–1278.

Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001; 289(1): 150–154.

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: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 2009; 15(2): 62–69.

Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 2002; 16(3): 223–229.

Nakamura N, Ito K, Takahashi M, Kawamoto M, Yamanaka M, Taniguchi A, Gemma N. Detection of six single-nucleotide polymorphisms associated with Rheumatoid Arthritis by a loop-mediated isothermal amplification method and an electrochemical DNA chip. *Anal. Chem.*, 2007; 79(24): 9484–9493.

Nakao R, Stromdahl EY, Magona JW, Faburay B, Namangala B, Malele I, Sugimoto C. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection of *Ehrlichia ruminantium*. *BMC Microbiology*, 2010; 10(1): 296.

Njiru ZK, Mikosza ASJ, Armstrong T, Enyaru JC, Ndung'u JM, Thompson ARC. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2008; 2(1): e147.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 2008; 28(12).

Nzelu CO, Gomez EA, Cáceres AG, Sakurai T, Martini-Robles L, Uezato H, Kato H. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid mass-screening of sand flies for *Leishmania* infection. *Acta Tropica*, 2014; 132: 1–6.

Okafuji T, Yoshida N, Fujino M, Motegi Y, Ihara T, Ota Y, Nakayama T. Rapid diagnostic method for detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification, 2005; 43(4): 1625–1631.

Oliveira SDL, Carvalho DO, Capurro ML. Mosquito transgênico: do paper para a realidade. *Revista da Biologia*, 2011; 6b: 38–43.

Pan X, Zhou G, Wu J, Bian G, Lu P, Raikhel AS, Xi Z. *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control Dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012; 109(1): E23–31.

Parida M, Posadas G, Inoue S, Hasebe F, Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile Virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004; 42(1), 257-263.

Parida M, Horioke K, Ishida H, Dash K, Saxena P, Jana AM, Dash PK, Islam M. A, Inoue S, Hosaka N. Rapid detection and differentiation of Dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005; 43(6): 2895-2903.

Parida MM, Santhosh SR, Dash PK, Tripathi NK, Lakshmi V, Mamidi N, Morita K. Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007; 45(2): 351–357.

Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PVL, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol*, 2008; 18(Aug): 407–421.

Peyrefitte CN, Boubis L, Coudrier D, Bouloy M, Grandadam M, Tolou HJ, Plumet S. Real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of rift valley Fever virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008; 46(11): 3653–3659.

Rancès E, Ye YH, Woolfit M, McGraw EA, O'Neill SL. The relative importance of innate immune priming in *Wolbachia*-mediated Dengue interference. *PLoS Pathogens*, 2012; 8(2).

Rasgon JL, Gamston CE, Ren X. Survival of *Wolbachia pipientis* in cell-free medium. *Appl Environ Microbiol*, 2006; 72(11): 6934–6937.

Riehle MA, Jacobs-Lorena M. Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: current and future strategies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2005; 35(7): 699–707.

Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P, Solignac M. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc Biol Sci*, 1992; 250(1328): 91–98.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 1992; 24: 476–480.

Salzberg SL, Dunning Hotopp JC, Delcher AL, Pop M, Smith DR, Eisen MB, Nelson WC. Serendipitous discovery of *Wolbachia* genomes in multiple *Drosophila* species. *Genome Biology*, 2005; 6(R23).

Simoes P, Mialdea G, Reiss D, Sagot F, Charlat S. *Wolbachia* detection: an assessment of standard PCR protocols. *Molecular Ecology Resources*, 2011; 11: 567–572.

Sinkins SP, O'Neill SL. *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations. In A. A. James (Ed.), *Insect Transgenesis: Methods And Applications*, 2000; 271–287.

Song L, Li J, Hou S, Li X, Chen S. Establishment of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Brucella* spp. and application to milk and blood samples. *Journal of Microbiological Methods*, 2012; 90(3): 292–297.

Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD. *Wolbachia pipientis*: Microbial Manipulator of Arthropod Reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1999; 53: 71–102.

Tao ZY, Zhou HY, Xia H, Xu S, Zhu HW, Culleton RL, Han E, Lu F, et al. Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of *Plasmodium vivax* infection. *Parasites & Vectors*, 2011; 4(1): 115.

Teixeira L, Ferreira A, Ashburner M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol*, 2008; 6: e2.

Thi H, Thai C, Le MQ, Vuong CD, Parida M, Minekawa H, Hasebe F. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of Severe acute respiratory syndrome coronavirus, 2004; 42(5): 1956–1961.

Thomas P, Kenny N, Eyles D, Moreira LA, O'Neill SL, Asgari S. Infection with the wMel and wMelPop strains of *Wolbachia* leads to higher levels of melanization in the hemolymph of *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans* and *Aedes aegypti*. *Devel and Comparative Immunology*, 2011; 35(3): 360–365.

Turelli M, Hoffmann AA. Microbe-induced cytoplasmic incompatibility as a mechanism for introducing transgenes into arthropod populations. *Insect Molecular Biology*, 1999; 8: 243–255.

Turley AP, Moreira LA, O'Neill SL, McGraw EA. *Wolbachia* infection reduces blood-feeding success in the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2009; 3(9): e516.

Ushikubo H. Principle of LAMP method - a simple and rapid gene amplification method. *Uirusu*, 2004; 54(1): 107–112.

Van den Hurk AF, Hall-Mendelin S, Pyke AT, Frentiu FD, McElroy K, Day A, O'Neill SL. Impact of *Wolbachia* on infection with Chikungunya and Yellow Fever viruses in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012; 6(11): e1892.

Vandekerckhove TTM, Watteyne S, Bonne W, Vanacker D, Devaere S, Rumes B, Mertens J. Evolutionary trends in feminization and intersexuality in woodlice (Crustacea, Isopoda) infected with *Wolbachia pipientis* (α -proteobacteria). *Belg. J. Zool.*, 2003; 133(1): 61–69.

Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, Hoffmann AA. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, 2011; 476: 450–U101.

Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol*, 2008; 6: 741–751.

Werren JH, Wan Z, Guo LR. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond.*, 1995; 261: 55–71.

Whiting SH, Champoux JJ. Properties of strand displacement synthesis by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase: mechanistic implications. *Journal of Molecular Biology*, 1998; 278(3): 559–577.

WHO. Dengue and Severe Dengue. *World Health Organization*. 2014.

Yeap HL, Mee P, Walker T, Weeks AR, O'Neill SL, Johnson P, Hoffmann AA. Dynamics of the "popcorn" *Wolbachia* infection in outbred *Aedes aegypti* informs prospects for mosquito vector control. *Genetics*, 2011; 187: 583–595.

Yen JH, Barr AR. The Etiological Agent of Cytoplasmic Incompatibility in *Culex pipiens*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1973; 22: 242–250.

Yen JH, Barr AR. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Nature*, 1971; 232: 657–658.

Yoneyama T, Kiyohara T, Shimasaki N, Kobayashi G, Ota Y, Notomi T, Wakita T. Rapid and real-time detection of hepatitis A virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Virological Methods*, 2007; 145(2): 162–168.

Yun J, Roh S, Whon T, Jung M, Kim M, Park D, Bae J. Insect gut bacterial diversity determined by host environmental habitat, diet, developmental stage and phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014; 01226.

Zouache K, Voronin D, Tran-Van V, Mousson L, Failloux AB, Mavingui P. Persistent *Wolbachia* and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*. *PLoS One*, 2009; 4(7): e6388.

Zug R, Hammerstein P. Still a Host of Hosts for *Wolbachia*: Analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial Arthropod species are infected. *PLoS One*, 2012; 7(6): e38544.