



Implementação de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR-Real Time) para a Detecção e Quantificação de Leishmaniose Visceral

Vinicius Proença da Silveira¹, Patrícia de Freitas Salla², Nilo Ikuta³, Vagner Ricardo Lunge³

¹ Aluno de Medicina Veterinária da ULBRA – Bolsista CNPq – vinicius-dasilveira@hotmail.com

² Aluna de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

³ Professor do curso de graduação Medicina Veterinária, e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – vagner.lunge@gmail.com

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença causada por um protozoário do gênero *Leishmania*, que parasita células do sistema fagocitário mononuclear. Este parasito é transmitido pelo mosquito-palha (*Lutzomyia spp.*) que, durante o repasse sanguíneo, inocula o agente em um hospedeiro suscetível (homem, cão, etc.). A doença pode apresentar duas formas clínicas: a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), caracterizada por lesões cutâneas causadas por uma diversidade de espécies (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. lindenberg*, *L. shawi* e *L. amazonenses*), e a Leishmaniose Visceral (LV), que apresenta sinais sistêmicos com comprometimento de órgãos e é causada por apenas duas espécies (*L. donovani* e *L. infantum*). Estes parasitas possuem um ciclo epidemiológico silvestre, com canídeos silvestres e marsupiais sendo reservatórios, e um ciclo peridomiciliar, onde o cão doméstico participa como principal reservatório. Casos de LV no homem têm sido registrados nos estados do Norte do Brasil, normalmente em populações de baixa renda e próxima a zonas rurais, tendo crianças como indivíduos mais suscetíveis. Mais recentemente, casos têm sido reportados no Rio Grande do Sul (principalmente na região metropolitana de Porto Alegre) e associados à ocorrência mútua em cães domésticos (reservatórios).

OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo implementar metodologias de diagnóstico molecular, em PCR-Real Time, para a investigação e caracterização molecular da ocorrência de infecção pelos agentes etiológicos da LV (*L. donovani* e *L. infantum*) em animais reservatório no Estado do Rio Grande do Sul.

METODOLOGIA



Para localizar uma região genômica conservada do *Leishmania infantum* foi realizado uma revisão bibliográfica e selecionado primers específicos para a espécie.

As reações de amplificação foram estabelecidas por ensaio laboratorial de análise de DNA de LV com cascata de diluição de base 10.

O projeto foi submetido à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da ULBRA, antes do início da realização das coletas de amostras de cães com suspeita LV da rotina do Hospital Veterinário da ULBRA, clínicas veterinárias, canis públicos/privados e ONG's.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise *in silico* das sequências de *Leishmania ssp.* brasileiras presentes no banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI), resultou no alinhamento de 26 sequências de DNA da região do kinetoplast minicircle. FANCINO et al.(2006) descreveu a utilização de *primers* que apresentavam maior especificidade quando localizados *in silico* no alinhamento da sequências brasileiras, sendo a região de amplificação conservada entre as espécies do protozoário. BARRAGÁN et al.(2016), também realizou uma análise *in silico* utilizando *primers* de estudos anteriores, porém os *primers* não são espécie específicos para as 26 sequências analisadas neste estudo.

Para avaliação dos *primers* utilizados neste estudo, descritos por FANCINO et al.(2006), foi realizado um ensaio no qual utilizou-se uma amostra de sangue sabidamente positiva para leishmaniose, *cycle threshold* (Ct) de 22,94, em duplicata, realizando uma cascata de diluição de base 10; uma amostra positiva para Cinomose também em diluição de base 10 e o controle negativo. Como resultado da amplificação obtive-se valores positivos para as amostras de leishmaniose: Ct de 14,7 para o concentrado; Ct de 18 para a primeira diluição (10x); Ct de 21,6 para a segunda diluição (100x) e Ct de 24,8 para a última diluição (1000x). Em todas as diluições o deslocamento de Cts foi coerente, a amostra de Cinomose, negativou para o concentrado e para as diluições, assim como o esperado para o controle negativo.

REFERÊNCIAS

- BASANO, S.A. e CAMARGO L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Rev. Bras. Epidemiol. Vol. 7, nº 3, 2004
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- CARVALHO, A.A.; MACÊDO, É.L.; VERÇOSA, B.L.A.; SILVA, S.M.M.; CARVALHO, S.M.; COSTA, F.A.L. Caracterização histológica e imunoistoquímica da nefropatia da leishmaniose visceral experimental em hamster. Clínica Veterinária, ano 12, n.71, p.60-64, 2007.
- FOCACCIA R., FERREIRA M. S., SICILIANO R. F. VERONESI-FOCACCIA: Tratado de Infectologia. Editora Atheneu, 4. ed., 2 v., São Paulo, 2010.
- LOSADA-BARRAGÁN, M.; CAVALCANTI, A.; et al. Veterinary Parasitology Detection and quantification of *Leishmania infantum* in naturally and experimentally infected animal samples., v. 226, p. 5-64, 2016

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de diagnóstico por PCR-Real time será utilizada para analisar novas amostras coletadas de cães da rotina do hospital veterinário da Universidade Luterana do Brasil, assim como amostras cedidas por clínicas, canis municipais e ONG's com suspeita de leishmaniose.