PESQUISA
SÃO - GESTÃO
DISSOCIABILIDADE
O UNIVERSITÁRIA

ISSN 1806-549 X

Autor(es): SUZANA DANIELE DE ALMEIDA

# Diagnóstico molecular de leishmaniose em cães da cidade de Montes Claros, Minas Gerais

### Introdução

As leishmanioses são doenças parasitárias, causadas por protozoários intracelulares pertencentes ao gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, sendo transmitidas pela picada de um inseto vetor do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (ALEXANDER; MAROLI, 2003). Os parasitas possuem um clico heteroxênico, que alternam entre estágios de vida de hospeiros mamíferos e invertebrados, desta forma, duas formas distintas em seu ciclo biológico: promastigotas e amastigotas. Os flebotomíneos, hospedeiros invertebrados, são infectados por meio de reservatórios contaminados, que são cruciais para a instalação da doença. A *Leishmania* se desenvolve no tubo digestivo do inseto, passando as promastigotas por várias mudanças até se diferenciarem em promastigotas metacíclicas, forma infectante para o hospedeiro vertebrado (BATES, 2007).

A Leishmaniose Visceral (LV) ocorre no Brasil em quase todas as regiões, indo do norte e nordeste até as regiões centro-oeste e sudeste.

Os cães desempenham um papel importante no ciclo de transmissão doméstico de LV, pois compõem o reservatório principal de *L. infantum chagasi*. O avanço da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) devido a infecção por *Leishmania*, possui respostas diferentes entre cães infectados, haja vista que alguns animais são acometidos por sintomas graves que podem levar à morte precoce, enquanto outros podem nunca desenvolver a doença (ALVAR et al., 2004). Logo, precauções epidemiológicas, são necessárias não só para identificação de parasitas, mas também para identificação das espécies. É importante o conhecimento das espécies de *Leishmania*, em se tratando da epidemiologia das leishmanioses, principalmente em regiões endêmicas com ocorrência simultânea de formas visceral e tegumentar da doença (QUARESMA et al., 2009).

Medidas de controle para a Leishmaniose são necessárias. No Brasil, as mais dominantes estão relacionadas na descontinuidade do ciclo de transmissão envolvendo diagnóstico e tratamento nos humanos, uso de inseticidas para controle vetorial e triagem sorológica seguida de eutanásia em cães positivos para a doença (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001).

A leishmaniose tem sido diagnosticada por vários métodos descritos na literatura. Os diagnósticos sorológicos mais utilizados em levantamentos epidemiológicos, por conseguinte, os mais empregados são o teste de Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e teste imunocromatográfico rápido DPP. Estudos tem demonstrado que a PCR é a técnica mais vantajosa de diagnóstico usando amostras como pele, conjuntiva, medula óssea e aspirados de linfonodos. A sensibilidade e a especificidade da técnica permitem a detecção de parasitas em pacientes que estão clinicamente saudáveis há muitos anos, sendo, portanto, um método diagnóstico confiável e promissor. Com isso, o objetivo do trabalho é estabelecer um protocolo eficiente de diagnóstico molecular de Leishmaniose Visceral por PCR na cidade de Montes Claros.

#### Material e métodos

A. Coleta das amostras

Foram coletadas 100 amostras da secreção ocular de cães do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) em Montes Claros – Minas Gerais, sendo estas colhidas dos olhos esquerdo e direito de cada animal utilizando swabs estéreis, totalizando 50 cães diferentes. Após cada coleta, os swabs foram então cortados e as regiões com as secreções foram depositadas individualmente em eppendorfs e congeladas à -20°C no Laboratório de Bioprospecção e Recursos Genéticos da UNIMONTES.

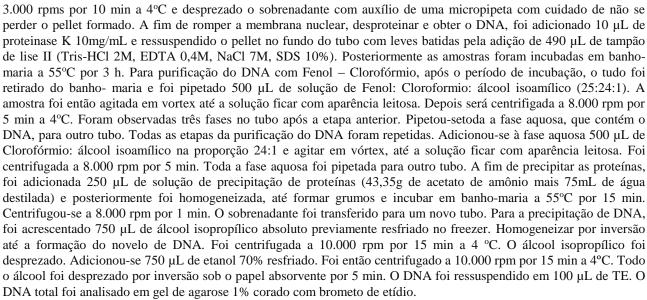
Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método fenol-clorofórmio descrito por SAMBROOK E RUSSELL (2001). Para lise celular, no mesmo tubo contendo parte do swab, foi adicionado 1 mL de tampão de lise I (Tris-HCl 2M, MgCl 2M, NaCl 3M), sendo depois homogeinizado por inversão e manter resfriado por 10 min. Foi centrifugado a









B. Reação em Cadeia da Polimerase

Foi realizada a PCR convencional, utilizando os primers D1 (5'-CCAGTTTCCCGCCCCG -3') e D2 (5'-GGGGTTGGTGGTGTAAAATAG-3') que amplificam aproximadamente 780- 36 800pb, tendo como alvo o minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) das espécies de *Leishmania* sp. causadoras de LV (SMYTH et al., 1992).

A reação de PCR foi feita para um volume total de 10μl, contendo Tampão de Taq (10 mM Tris-HCl, 50mM KCl), 0,4mM de dNTPs, 0,6mM MgCl2, 0,9mM de cada iniciador, 1 U Taq DNA polimerase e 2μl de DNA extraído. A reação foi submetida a uma temperatura inicial de 94°C por 5 minutos para desnaturação das fitas duplas de DNA, seguido de 35 ciclos nas seguintes temperaturas: 50°C por 1 minuto para anelamento dos primers e 72°C por 1 minuto e 30 segundos para extensão das novas fitas de DNA.

Posteriormente o produto da PCR foi corrido em gel de agarose a 1% corado com Brometo de Etídio, para avaliação do padrão de bandas.

#### Resultados e discussão

Das amostras coletadas dos 50 cães, apenas 9 (13, 14, 16, 21, 37, 39, 42, 47, 50) obtiveram êxito na extração de DNA. O alto número de insucesso nas extrações de DNA obtidas pode ter relação com a ausência de solução temponada para conservação da amostra, como é utilizada em outros trabalhos (ARAÚJO, 2013), ou por falhas no protocolo. Das 9 extrações de DNA que obtiveram bom resultado, utilizando o iniciador que tem como alvo kDNA do parasita, apenas 4 amplificaram no padrão de banda desejado, de 780pb (13E, 14D, 16D, 39D).

Diversos outros iniciadores foram desenvolvidos para pesquisa de DNA de *Leishmania* tendo como alvo o kDNA. Bem como o uso de iniciadores com alvos distintos no parasita *Leishmania*: R221 tendo como alvo o gene SSU-rRNA; LITSR tendo como alvo o gene SSU-rRNA; L5.8S com alvo o gene 5.8S-rRNA; primers com alvo nos genes Mini-Exon; dentre outros.

#### Conclusão/Conclusões/Considerações finais

Os resultados obtidos permitem concluir que é possível a realização de um método para diagnosticar Leishmaniose Visceral Canina que não seja tão invasivo para o animal. Porém a técnica utilizada de detecção da doença utilizando swab com secreção ocular ainda necessita de melhoras no protocolo.

#### Agradecimentos

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG pelo financiamento do projeto.













## Referências bibliográficas

ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of phlebotomine sandflies. Medical and veterinary entomology, v. 17, n. 1, p. 1-18, 2003.

ALVAR, J. et al. Advances in Parasitology Volume 57. [s.l.] Elsevier, 2004. v. 57

ARAÚJO, Ana Isabele. Avaliação do método de coleta através do swab para o diagnóstico molecular da leishmaniose tegumentar americana em pacientes de áreas endêmicas de pernambuco, brasil. 2013. 92 f. Tese (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2013.

BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. International Journal for Parasitology, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 65, n. 5, p. 510–7, 2001.

QUARESMA, P. F. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of Leishmania species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. Acta Tropica, v. 111, n. 3, p. 289–294, 2009.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 3 ed ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SMYTH AJ et al. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 183-192, 1997