



CONEXÃO UNIFAMETRO 2020

XVI SEMANA ACADÊMICA

ISSN: 2357-8645

DETECÇÃO DE *LEISHMANIA INFANTUM* EM AMOSTRAS DE SWAB OCULAR FELINO ATRAVÉS DE PCR EM TEMPO REAL: VALIDAÇÃO METODOLÓGICA

Joel Veras de Oliveira¹

Luciana Magalhães Melo²

Sâmara Bryda da Silva³

Claudia Maria Leal Bevilaqua⁴

Helcileia Dias Santos⁵

Ana Caroline Moura Rodrigues Ciríaco⁶

Discente do curso de graduação em Medicina Veterinária da UNIFAMETRO - IC¹

Docente do curso de graduação em Medicina Veterinária da UNIFAMETRO - Orientadora²

Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UECE³

Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UECE⁴

Docente do Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da UFT⁴

Docente do curso de graduação em Medicina Veterinária da UNIFAMETRO⁶

joel.oliveira01@aluno.unifametro.edu.br

Área Temática: Clínica e biotecnologias aplicadas em medicina veterinária

Encontro Científico: VIII Encontro de Monitoria e Iniciação Científica

RESUMO

Introdução: A leishmaniose visceral (LV) é uma doença zoonótica que atinge humanos e cães domésticos (*Canis lupus familiaris*), causada no Brasil pelo protozoário *Leishmania infantum*. Os cães são considerados os principais reservatórios urbanos do parasita. Contudo, estudos recentes apontam o gato doméstico (*Felis catus*) como possível reservatório adicional do parasito, mesmo sendo uma espécie assintomática para a LV. **Objetivo:** Assim, o presente estudo teve como objetivo validar uma metodologia baseada em PCR em tempo real (qPCR) para detecção de *L. infantum*, em amostras de swab ocular felino (SOFel). **Métodos:** Para tanto, primers específicos para amplificação de DNA mitocondrial felino foram testados em amostras de sangue e SOFel. Adicionalmente, a eficiência e a sensibilidade de detecção de DNA de *L. infantum* em amostras de DNA de SOFel foi acessada através da amplificação de kDNA do parasito. **Resultados:** A estratégia metodológica descrita no presente trabalho permitiu a detecção de cerca de duas dezenas de parasitos por amostra de SOFel. A estratégia apresentou-se robusta na certificação e pacientes negativos, através da amplificação eficiente de DNA mitocondrial do próprio animal. **Conclusão/ Considerações finais:** Finalmente, o uso de amostragem não-invasiva, rápida e que dispensa elevado treinamento técnico é muito útil na triagem de felinos para pesquisa de possíveis reservatórios urbanos da leishmaniose visceral. Uma vez que esses animais são geralmente assintomáticos, a aplicação de uma abordagem com essas vantagens contribuirá fortemente com levantamento de dados epidemiológicos relevantes para a doença.

Palavras-chave: Leishmania; qPCR; gato; calazar.

Financiamento: O presente trabalho foi realizado com apoio do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica na Amazônia (PROCAD/Amazônia) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença zoonótica causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, endêmica em pelo menos 88 países, incluindo o Brasil. Em nosso país, essa patologia é transmitida principalmente pelo díptero do gênero *Lutzomyia* (SPADA et al., 2016). Os cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) são os considerados principais reservatórios urbanos do parasita para os seres humanos.

Estudos recentes apontam que *Leishmania infantum*, também pode ser detectada em felinos domésticos (*Felis catus*) em áreas endêmicas para a leishmaniose visceral (LV) canina e humana (PENNISI & PERSICHETTI, 2018). Esses estudos indicam ainda que o vetor passa a albergar o parasito após o repasto sanguíneo em animais parasitados. Assim, uma vez que gatos não-domiciliados estão em constante exposição ao vetor, sem nenhuma medida profilática, o papel do gato no ciclo urbano da LV vem sendo revisado (SPADA et al., 2016).

Outro aspecto relevante para a epidemiologia da LV é que felinos domésticos são assintomáticos, podendo apresentar somente lesões de pele ou oculares de forma extremamente variável. Tal fato dificulta sobremaneira a obtenção de dados epidemiológicos, uma vez que raramente haverá indicação clínica para detecção de *L. infantum* em gatos. Adicionalmente, diferente do que ocorre com cães e humanos, a estratégia de detecção desse parasito em felinos também não é plenamente estabelecida. Assim, resultados negativos em testes de sorologia não descartam a presença do parasito, uma vez que a soroconversão é variável em gatos (PENNISI & PERSICHETTI, 2018).

Nesse contexto, estratégias baseadas em PCR em tempo real (qPCR) vêm sendo aplicadas para a detecção de *L. infantum* em felinos domésticos, uma vez que oferecem maior sensibilidade e especificidade. Adicionalmente, essas estratégias viabilizam uso de técnicas alternativas mais práticas e rápidas, como o swab ocular, para amostragem de animais aparentemente sadios (BENASSI, 2015).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo validar uma metodologia baseada em qPCR para detecção de *L. infantum*, em amostras de swab ocular felino (SOFel). Para tanto, primers específicos para amplificação de DNA mitocondrial felino foram testados em amostras de sangue e SOFel. Adicionalmente, a eficiência e a sensibilidade de detecção de DNA de *L. infantum* em amostras de DNA de SOFel foi acessada através da construção de curva-

padrão de amplificação de kDNA do parasito.

METODOLOGIA

1. Material biológico e ética animal

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE) em abril do ano corrente. Amostras de sangue periférico felino (SFel, n=2) foram cedidas pelo Hemocentro do Centro Integrado Veterinário (CINVET). As amostras foram preservadas resfriadas e processadas no prazo máximo de 6h. As amostras de swabs oculares felinos (SOFel, n=4) foram coletadas no mesmo local de 2 animais saudáveis, duas de olho esquerdo e duas de direito. As amostras foram preservadas em temperatura ambiente e processadas no prazo máximo de 4h.

2. Extração de DNA

As extrações de DNA de SFel e SOFel foram realizadas utilizando o Purelink Genomic DNA Mini kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). Seguindo-se as instruções do fabricante. Cada amostra de DNA foi eluída em 50µL de água livre de nucleases.

3. Reações de PCR em tempo real (qPCR)

Cada reação de amplificação por qPCR consistiu em um volume total de 20µL, contendo 2× Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA), primers (concentração final variando de 0,2 a 0,6µM), amostra de DNA e água ultrapura. As reações de PCR foram realizadas no termociclador QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA) e a ciclagem térmica consistiu em incubação inicial a 95° C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação a 95° C por 15 segundos e 60° C por 60 segundos. A curva de *melting* dos *amplicons* obtidos foi traçada através de procedimento padrão do equipamento, com temperatura variando de 60° C a 95° C.

4. Experimento 1: PCR em tempo real de DNA mitocondrial (mtDNA) felino

Para amplificação de mtDNA felino, foram comparados os desempenhos de amplificação de dois pares de primers (Catmt e Camt1, **Tabela 1**). As reações de qPCR foram realizadas com amostras de DNA de SFel a 50ng/µL, em triplicata, conforme descrito previamente. O par de primers com melhor desempenho na etapa anterior foi submetido a ajuste de concentração. Assim, as reações de qPCR foram realizadas com amostras de DNA de SFel a 50ng/µL, em triplicata, conforme descrito previamente, nas seguintes concentrações finais de primers: 0,2, 0,3 e 0,6µM. A sensibilidade e eficiência de amplificação do par de primers com

melhor desempenho foi acessada através da confecção de curva-padrão de amplificação, construída por diluição em série do DNA de SFel (68,1ng/ μ L a 68,1pg/ μ L). As reações de qPCR foram realizadas em triplicata, conforme descrito previamente.

5. Experimento 2: Amplificação de DNA em amostras swab ocular felino (SOFel)

Os métodos de coleta de amostras (swab seco e swab úmido) foram comparados. Essas amostras foram obtidas através de movimentos semicirculares do swab estéril delicadamente em contato com conjuntiva da pálpebra inferior do olho do animal. As amostras de olho direito foram realizadas com swab seco (ODS) e as de olho esquerdo com swab umedecido (OEU) com 200 μ L de PBS (Tampão Fosfato-Salino) livres de RNAase e DNAase. As amostras de DNA de OEU e ODS foram utilizadas como molde em reações de qPCR nas proporções de 1:20 (v:v) e 2:30 (v:v), em triplicata, com o par de primers de amplificação de mtDNA felino para o qual foi construída a curva-padrão de amplificação, conforme descrito previamente. Visando acessar a sensibilidade de detecção de DNA de *L. infantum* em amostras de SOFel, uma curva-padrão de amplificação com o par de primers upKDNA (**Tabela 1**) foi construída. Para tanto, realizou-se diluição em série de DNA de leishmania em amostra de DNA de SOFel, obtendo-se as concentrações finais variando de 50.000 *Leishmanias*/ μ L até 0,05 *Leishmanias*/ μ L. As reações de qPCR foram realizadas em triplicata como descrito previamente e a concentração de primers foi de 10 μ M.

6. Análise dos dados

As especificidades das reações de qPCR foram determinadas através de análise da curva de *melting* dos *amplicons* obtidos. Valores de *threshold cycle* (Ct) foram determinados automaticamente no QuantStudio Design&Analysis Software v.1.4.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Os valores de Ct foram expressos como média (\pm DP). Nas curvas-padrão, a sensibilidade foi estabelecida pela menor concentração de DNA que poderia ser amplificado com sucesso nas reações. Os parâmetros das curvas como Eficiência e Linearidade (R^2) foram analisados qualitativamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Experimento 1: PCR em tempo real de DNA mitocondrial (mtDNA) felino

A **Figura 1** mostra a curva de *melting* dos *amplicons* de mtDNA felino obtidos por reações de qPCR com os pares de primers Catmt e Camt1. Observa-se que o par de primers Catmt não gerou produtos específicos em amostra de DNA de SFel.

Em seguida, o par de primers Camt-1 foi submetido à triagem para ajuste de concentração (**Tabela 2**). O par de primers produziu *amplicons* em todas as reações, gerando valores de Ct decrescentes com o aumento da concentração. Assim, a concentração de 0,6 μ M foi considerada a mais apropriada para construção a curva-padrão de amplificação de mtDNA felino (**Figura 2**). A curva-padrão apresentou valor de *slope* de -3,27, eficiência de 102,17 e linearidade (R^2) de 0,99, estando compatíveis com quantificação acurada (KUBISTA et al., 2006) até a diluição de 68,1pg/ μ L. Assim, o teste ofereceu alta sensibilidade, permitindo a detecção da ordem de picogramas de DNA mitocondrial felino (**Figura 2**).

2. Experimento 2: Amplificação de DNA em amostras swab ocular felino (SOFel)

A amplificação de mtDNA das amostras obtidas através dos diferentes métodos de coleta de amostras (swab seco e swab úmido) estão apresentados na **Tabela 3**. O par de primers Camt1 produziu *amplicons* em todas as reações, gerando valores de Ct variando de 18,04 \pm 0,58 até 19,22 \pm 1,47. Isso mostra que há uma celularidade na conjuntiva para uma possível detecção de leishmania a partir do swab. A amostra colhida através de swab úmido PBS parece fornecer valores de Ct numericamente menores, podendo ser mais indicada que o swab seco.

A curva-padrão de amplificação de kDNA de *L. infantum* usando os iniciadores upKDNA-SE/AS em amostras de DNA obtidas de SOFel está apresentada na **Figura 3**. Essa curva simula a detecção desse parasito em amostras de swab ocular felino, permitindo detecção tão sensível quanto 25 *L. infantum* por swab. Adicionalmente, os parâmetros da curva (*slope* = -3,34, eficiência = 0,99 e linearidade = 0,97) indicam a possibilidade de quantificação acurada KUBISTA et al., 2006) da carga parasitária na amostra.

Alguns estudos, realizados no Brasil e em outros países, já relataram a detecção de *L. infantum* em felinos, mas muitas questões, especialmente relacionadas a amostragem e ajuste de estratégia metodológica, precisam ainda serem respondidas (PENNISI & PERSICHETTI, 2018). Nosso estudo demonstrou que há sensibilidade de detecção de DNA de *L. infantum* no swab ocular felino, sugerindo que existe possibilidade de diagnóstico de leishmaniose felina neste tipo de amostra. Este achado é de suma importância, pois não há consenso sobre a amostra biológica ideal para o diagnóstico molecular da leishmaniose felina (AKHTARDANESH et al., 2017). Assim, observa-se que a soropositividade felina é bastante variável, dependendo, por exemplo, da técnica sorológica aplicada, da prevalência endêmica do local da amostragem e da possibilidade de reações cruzadas com o outros parasitas (COSTA-VAL et al., 2020). Assim, a sorologia felina pode ser um parâmetro confiabilidade questionável para estudos comparativos

epidemiológicos.

Os felinos parasitados por *L. infantum*, em geral, possuem baixa produção de anticorpos e são assintomáticos. Assim, não é surpreendente que os testes sorológicos apresentem elevado índice de resultados falso negativos (NOE et al., 2015). Adicionalmente, apesar de qPCR ser considerada uma técnica muito sensível e específica (GARCIA et al., 2005), não há um consenso sobre a amostragem ideal para o diagnóstico molecular em felinos (AKHTARDANESH et al., 2017). Amostragens não invasivas, como swab ocular, tem relevância epidemiológica destacada por terem execução menos complexa, viabilizando triagem de grande número de animais (FERREIRA et al., 2012).

A compreensão do papel do gato na epidemiologia da *Leishmania infantum* é complexa, pois há diferenças na resposta imune entre cães e felinos, como também da falta de dados da capacidade dos vetores em transmitir o protozoário para os gatos naturalmente infectados, o que fortalece perspectivas futuras de padronização de procedimentos para um diagnóstico mais assertivo acerca da leishmaniose felina e como triagem de populações de gatos para um melhor entendimento da epidemiologia desta patologia, assim como o papel dos felinos como reservatórios (IATTA et al., 2019).

CONSIDERAÇÕES FINAIS/CONCLUSÃO

Amostras de DNA, obtidas de swab ocular felino, podem ser usadas para PCR em tempo real visando detecção de *L. infantum*. Em condições de simulação *in vitro*, a estratégia metodológica descrita no presente trabalho permite a detecção de cerca de duas dezenas de parasitos por amostra de swab ocular. Adicionalmente, a estratégia apresentou-se robusta na certificação e pacientes negativos, através da amplificação eficiente de DNA mitocondrial do próprio animal. Finalmente, o uso de amostragem não-invasiva, rápida e que dispensa elevado treinamento técnico é muito útil na triagem de felinos para pesquisa de possíveis reservatórios urbanos da leishmaniose visceral. Uma vez que esses animais são geralmente assintomáticos, a aplicação de uma abordagem com essas vantagens contribuirá fortemente com levantamento de dados epidemiológicos relevantes para a doença.

REFERÊNCIAS

AKHTARDANESH B, SHARIFI I, MOHAMMADI A, MOSTAFAVI M, HAKIMMIPOUR M, POURAFSHAR NG. **Feline visceral leishmaniasis in Kerman, southeast of Iran: serological and molecular study.** J Vector Borne Dis, 2017, 54(1): 96-102.

- BENASSI, J.P. **Detecção de Leishmania spp. por PCR em tempo real em amostras de swab conjuntival de cães, gatos e equinos.** Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) -Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, SP, 2015.
- COSTA-VAL AP, COURAFM, BARBIERI JM, DINIZL, SAMPAIO A, REISJKP, ET AL. **Serological study of feline leishmaniasis and molecular detection of Leishmania infantum and Leishmania braziliensis in cats (Felis catus).** Braz J Vet Parasitol 2020; 29(2): e003520. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020023>.
- SPADA, E. *et al.* **Prevalence of Leishmania infantum and co-infections in stray cats in northern Italy.** Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2016. 45 (2016) 53–58.
- FERREIRA SA, ITUASSU LT, MELO MN, ANDRADE AS. **Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR hybridization in Minas Gerais State, Brazil.** Vet Parasitol, 2012. 152(3-4): 257-263.
- GARCIA AL, KINDT A, QUISPE-TINTAYA KW, BERMUDEZ H, LLANOS A, AREVALO J, *et al.* **American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism.** Infect Genet Evol, 2005. 5(2): 109- 116.
- HORWITZ, D. F.; RODAN, I. **Behavioral awareness in the feline consultation Understanding physical and emotional health.** Journal of Feline Medicine and Surgery, London, 2018. v. 20, p. 423–436.
- IATTA, I.; FURLANELLO, T.; COLELLA, V.; TARALLO, V. **A nationwide survey of Leishmania infantum infection in cats and associated risk factor in Italy.** PLoS neglected tropical diseases, 2019, 13 n. 7, p, e0007594.
- KUBISTA, M., ANDRADE, J. M., BENGTTSSON, M., FOROOTAN, A., JONAK, J., LIND, K., *et al.* **The real-time polymerase chain reaction.** Mol Aspects Med, 2006. 27(2-3): 95-125.
- NOE P, DOMINGOS SL, OSHIRO ET, LIMA RB, PIRMEZ C, PEDROSO TC, *et al.* **Detection of Leishmania chagasi in cats (Felis catus) from viscera leishmaniasis endemic area in Brazil.** Ciênc Anim, 2015. 25(4): 3-14.
- OLIVEIRA, A.R.R. **Quantificação de ADN nuclear e ADN mitocondrial por PCR em tempo real.** Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) -Faculdade de Ciências Departamento de Biologia Animal, Universidade de Lisboa, Portugal, 2009.
- PENNISI, M.G., PERSICHETTI, M.F. **Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog?** Veterinary Parasitology, 2018. 131–137.

TABELAS

Tabela 1. Primers para amplificação de DNA mitocondrial felino por qPCR.

Nome do primer	Sequência 5'-3'	Tamanho do produto (pb)
Camt1-SE	TGTGGCTCAAACCATAGCTTC	167
Camt1-AS	TGTGGAATGTCATTAAGAGGAG	
Catmt-SE	ACCAACTAGGTGGCCATAGTC	63
Catmt-AS	GTGCGGAGAGTGAGTCTGAG	
upkDNA-SE	GGGGGTGTCGTA AATCTGGA	79
upkDNA-AS	CCCGGAGGAAGAGAAAAGTT	

Tabela 2. Ajuste de concentração dos primers Camt-1SE/AS para qPCR de DNAm felino.

Concentração (µM)	Ct (média ± DP)
0,2	15,97 ± 0,11
0,3	13,78 ± 0,28
0,6	12,04 ± 1,09

Tabela 3. Concentração das amostras de swab ocular e as Ct média com desvio-padrão.

Amostra	Preservação	Diluição (v:v)	Ct (média ± DP)
ODS	Swab seco	1:20	19,22 ± 1,47
ODS	Swab seco	2:30	18,67 ± 1,14
OEU	Swab úmido	1:20	18,04 ± 0,58
OEU	Swab úmido	2:30	18,31 ± 1,12

FIGURAS

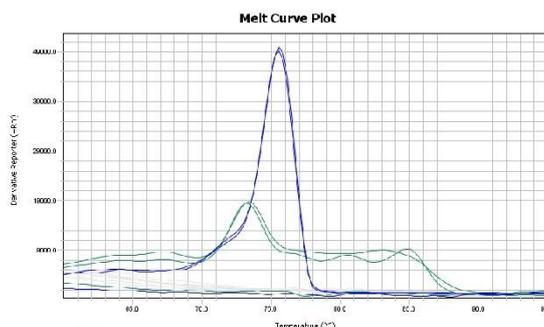


Figura 1: Triagem de primers para amplificação de mtDNA felino. As curvas de *melting* dos produtos de qPCR para Camt1 (azul) e Catmt (verde) estão plotadas.

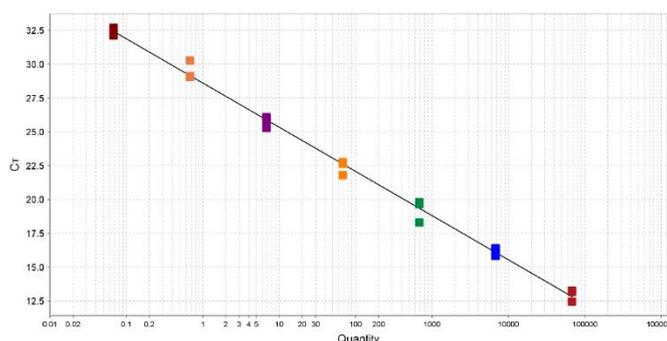


Figura 2: Curva-padrão de amplificação de DNAm_t de felino por qPCR usando Catmt. A sensibilidade da amplificação foi analisada através de diluição em série do DNA de SFel (68,1ng/μL a 68,1pg/μL). Parâmetros da curva: Eficiência=102,17, R² = 0,9933, Slope=-3,27.

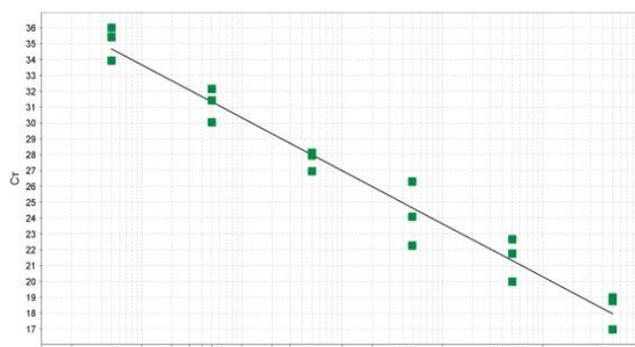


Figura 3. Curva-padrão de amplificação de kDNA de *L. infantum* por qPCR em swab ocular felino, usando upkDNA. A sensibilidade de amplificação foi equivalente à detecção de 25 leishmanias/swab. Parâmetros da curva: Eficiência=0,99, R²=0,965, Slope=-3,34.