

Detecção de *Leishmania infantum* em paciente felino através de PCR em tempo real

Pabliny Aparecida Guerra Morais

Iniciação Científica - Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

Pabliny.morais@aluno.unifametro.edu.br

Lorena de Oliveira Abreu

Iniciação Científica - Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

lorena.abreu01@aluno.unifametro.edu.br

Gabriela Pereira

Estágio Curricular Supervisionado I - Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

gabriela.pereira01@aluno.unifametro.edu.br

Helcileia Dias Santos

Pesquisadora - Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da UFT

hdsantos@mail.uft.edu.br

Claudia Maria Leal Bevilaqua

Pesquisadora - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UECE

claudia.bevilaqua@uece.br

Luciana Magalhães Melo

Professora orientadora – Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

luciana.melo@professor.unifametro.edu.br

Área Temática: Clínica e biotecnologias aplicadas em medicina veterinária

Área de Conhecimento: Ciências da Saúde

Encontro Científico: X Encontro de Iniciação à Pesquisa

RESUMO

Introdução: A leishmaniose visceral é uma doença que atinge humanos e cães, causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. Estudos apontam o gato doméstico como possível reservatório do parasito, além do cão. **Objetivo:** Detectar e quantificar *L. infantum* em amostras de paciente felino, através de PCR em tempo real (qPCR). **Métodos:** Amostras de sangue periférico (150µL) e aspirado de linfonodo (40µL) de um paciente felino oriundo de Araguaína, Tocantins, foram enviadas à seco, em papel de filtro, por 7 dias, em temperatura ambiente, para na Unidade de Pesquisa em Genética Molecular (UPGeM) da UNIFAMETRO. As amostras de DNA foram extraídas e avaliadas. A detecção e quantificação do parasito foi realizada através de amplificação de kDNA e construção de curva padrão para felino. **Resultados:** A paciente apresentava sinais clínicos leves e formas amastigotas do parasito nos aspirados das lesões cutâneas e de linfonodo. Através de qPCR, a carga parasitária estimada (média±d.p.) foi 50.181,49±10.388,43 leishmanias/µL de aspirado e 31,30±5,23 leishmanias/µL de sangue periférico. O estudo demonstrou ótima aplicabilidade do protocolo de qPCR desenvolvido pela UPGeM para detecção de *L. infantum* em amostras felinas. Destacando-se de forma especial os volumes reduzidos das amostras e seu transporte em condições simplificadas, sem uso de protetor químico de DNA. O presente estudo fortalece perspectivas futuras de padronização de procedimentos para detecção de *L. infantum* em felinos, aliando praticidade e assertividade, viabilizando a triagem de populações desses animais. Será possível promover um melhor entendimento da epidemiologia da leishmaniose visceral, assim como o papel dos felinos como reservatórios do parasito.

Palavras-chave: Leishmaniose; 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 são classicamente considerados os principais reservatórios urbanos do parasita para os seres humanos. Contudo, um número crescente de estudos vem apontando que *Leishmania infantum* também pode estar presente em felinos domésticos em áreas endêmicas para a leishmaniose visceral (LV) canina e humana (PENNISI & PERSICHETTI, 2018). 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 em diversos estudos investigativos para a detecção de *L. infantum* em felinos domésticos, uma vez que se apresentam elevada sensibilidade e especificidade. Adicionalmente, essas técnicas podem ser associadas a estratégias de amostragem que sejam práticas e rápidas, viabilizando triagem de uma grande amostragem de animais aparentemente saudáveis (BENASSI, 2015).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo detectar e quantificar *L. infantum* em amostras de paciente felino, através de PCR em tempo real (qPCR). Conseqüentemente, validar uma metodologia baseada em qPCR para detecção do parasito em amostras felinas, como sangue periférico e aspirado de linfonodo, transportadas à seco, em papel de filtro, e em temperatura ambiente.

METODOLOGIA

1. Material biológico e ética

As amostras biológicas, sangue periférico (150 μ L) e aspirado de linfonodo (40 μ L), de 1 paciente felino atendido na unidade veterinária da Universidade Federal do Tocantins foram colhidas pelo Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFNT e enviadas à seco, absorvidas em papel de filtro, em temperatura ambiente para a UPGeM, em Fortaleza, Ceará, tendo sido transportada em temperatura ambiente por cerca de 7 dias. O presente projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética para uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (n. 0753797/2018).

A paciente tratava-se de fêmea da espécie felina, sem padrão racial definido, adulta, resgatada por organização não governamental e mantida na zona urbana de Araguaína, Tocantins. A paciente apresentava leve apatia, lesões no focinho e presença de formação nodular no lábio inferior, além de linfonodos superficiais aumentados.

3. Exame parasitológico direto

A pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp. foi realizada em amostras de aspirados de linfonodo, nódulo labial e sangue periférico da paciente. As lâminas foram observadas através de microscopia ótica de lâminas coradas pelo método panótico rápido e examinadas sob objetiva de imersão (1.000x).

3. Extração de DNA

As amostras de DNA foram obtidas através de protocolo, baseado em ligação do DNA total em resina de sílica, utilizando o Purelink Genomic DNA Mini kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). Um volume total de 150 μ L de amostras de sangue venoso periférico e 40 μ L de aspirado de medula óssea embebidos em papel de filtro (~2cm de diâmetro cada), foram acrescidas de 400 μ L de Purelink Genomic Digestion Buffer e 40 μ L de Proteinase K e incubado a 55° C por 30 minutos. O sobrenadante foi tratado com 20 μ L de RNase A (20 mg/mL) e incubado por 2min em temperatura ambiente. Após adição de 400 μ L de Purelink Genomic Lysis Buffer, incubação por 10 min a 55°C e adição de 400 μ L de etanol a 100%, o volume total foi transferido para a resina e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e a resina foi lavada com 500 μ L de solução tampão de lavagem-1 e com 500 μ L de solução tampão de lavagem-2. Cada amostra de DNA foi eluída com 30 μ L de água livre de nucleases. O DNA foi quantificado por espectrofotometria com Picodrop (Picodrop, UK).

4. Reações de PCR em tempo real (qPCR)

Cada reação de amplificação por PCR em tempo real consistiu em um volume total de 25µL, contendo 12,5µL Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA), 2,5µL primers (concentração final variando de 0,6 a 1,0µM), 1µL de amostra de DNA e 9µL 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* foi traçada através de procedimento padrão.

As detecções de *L. infantum* nas amostras foram realizadas reações de qPCR utilizando os primers apresentados na **Tabela 1**. DNA de *L. infantum* (500.000 leish/µL) foi utilizado como controle exógeno. Os parâmetros de Eficiência e Linearidade (R^2) das amplificações foram calculados pelo software QuantStudio Design&Analysis Software v.1.4.2 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Tabela 1. Primers para amplificação de kDNA em felinos por qPCR.

Nome do primer	Sequência 5'-3'	Tamanho do produto (pb)
upkDNA-SE	GGGGGTGTCGTAAATTCTGGA	79
upkDNA-AS	CCCGGAGGAAGAGAAAAGTT	

5. Curvas padrão de amplificação de kDNA

O par de primers upKDNA foi testado quanto ao seu limite de detecção de DNA para diagnóstico de *L. infantum* em felinos, na concentração de 1µM. Assim, as sensibilidades das amplificações foram analisadas através de curvas padrão construídas por diluição em série de DNA padrão de *L. infantum* (equivalente a 500.000 leishmanias/uL), misturado com DNA felino (8ng/µL). Adicionalmente, os parâmetros das curvas como Eficiência e Linearidade (R^2) foram avaliados qualitativamente.

7. Análise de dados

As reações de qPCR foram avaliadas através de análise das curvas de amplificação dos genes e 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, USA). Os valores de Ct (*Threshold cycle*) e Tm (*Melting temperature*) foram expressos em média ±d.p.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O papel epidemiológico dos felinos no ciclo de transmissão da leishmaniose visceral vem sendo apontada através da detecção de *L. infantum*. em amostras biológicas de felinos domésticos em áreas endêmicas para a LV canina e humana (CHAGAS et al., 2021). Esses estudos indicam ainda que o vetor passa a albergar o parasito após o repasto sanguíneo em animais parasitados. Esse papel potencial é especialmente importante para gatos não-domiciliados estão em constante exposição ao vetor, sem nenhuma medida profilática (SPADA et al., 2016).

Na presente investigação, detectou-se de forma inédita, na Unidade de Pesquisa em Genética Molecular (UPGeM) da UNIFAMETRO, a presença de DNA de *Leishmania infantum* em amostras biológicas de um paciente felino, através de PCR em tempo real (qPCR). A paciente tratava-se de fêmea da espécie felina, sem padrão racial definido, adulta, resgatada por organização não governamental e mantida na zona urbana de Araguaína, Tocantins. O animal foi atendido na unidade veterinária da Universidade Federal do Tocantins e as amostras foram colhidas pelo Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFNT. A suspeita de leishmaniose foi confirmada pela presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em amostras de aspirados de linfonodo e do nódulo labial, observadas através de microscopia ótica de lâminas coradas pelo método panótico rápido e examinadas sob objetiva de imersão (**Figura 1**). Não foram observados parasitos nas amostras de sangue periférico do paciente. A paciente apresentava leve apatia, lesões no focinho e presença de formação nodular no lábio inferior, além de linfonodos superficiais aumentados.

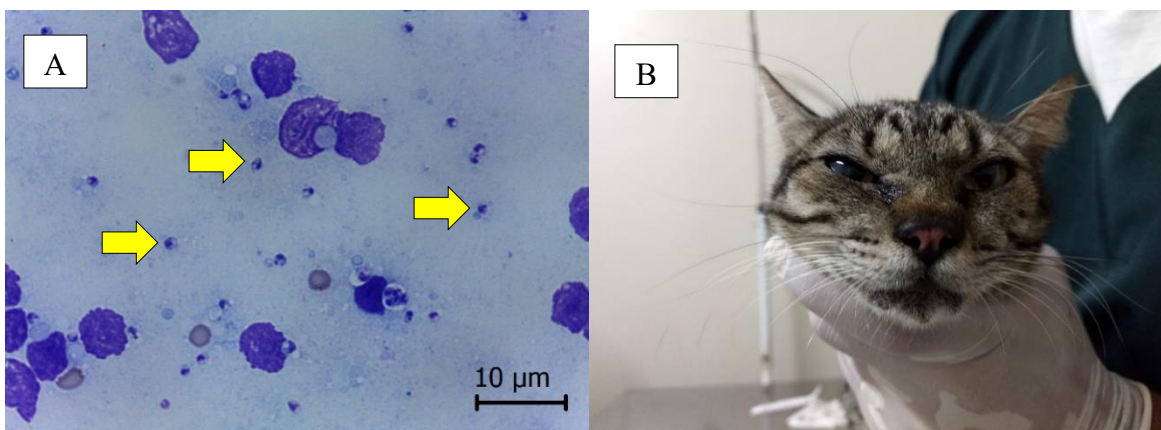


Figura 1: Microscopia ótica de aspirado de linfonodo (A) de gato fêmea (B) coradas pelo método panótico rápido e examinada sob microscopia ótica em objetiva de imersão (1000x). Formas amastigotas de *Leishmania infantum* (setas) foram observadas nos aspirados de linfonodo (A) e do nódulo labial (dados não apresentados).

Amostras de sangue periférico (150 μ L) e aspirado de linfonodo (40 μ L) foram enviadas à seco, absorvidas em papel de filtro, em temperatura ambiente para a UPGeM, em Fortaleza, Ceará, tendo sido transportada em temperatura ambiente por cerca de 7 dias. Esse material apresentou rendimento de cerca de 105ng de DNA total, correspondendo a 2,6ng DNA/ μ L de aspirado de linfonodo e 0,7ng DNA/ μ L de sangue. Esse quantitativo foi apropriado para a amplificação de DNA de *L. infantum* em ambas as amostras (**Figura 2**), indicando também a qualidade apropriada do DNA obtido, bem como realização correta dos procedimentos técnicos (**Tabela 2**).

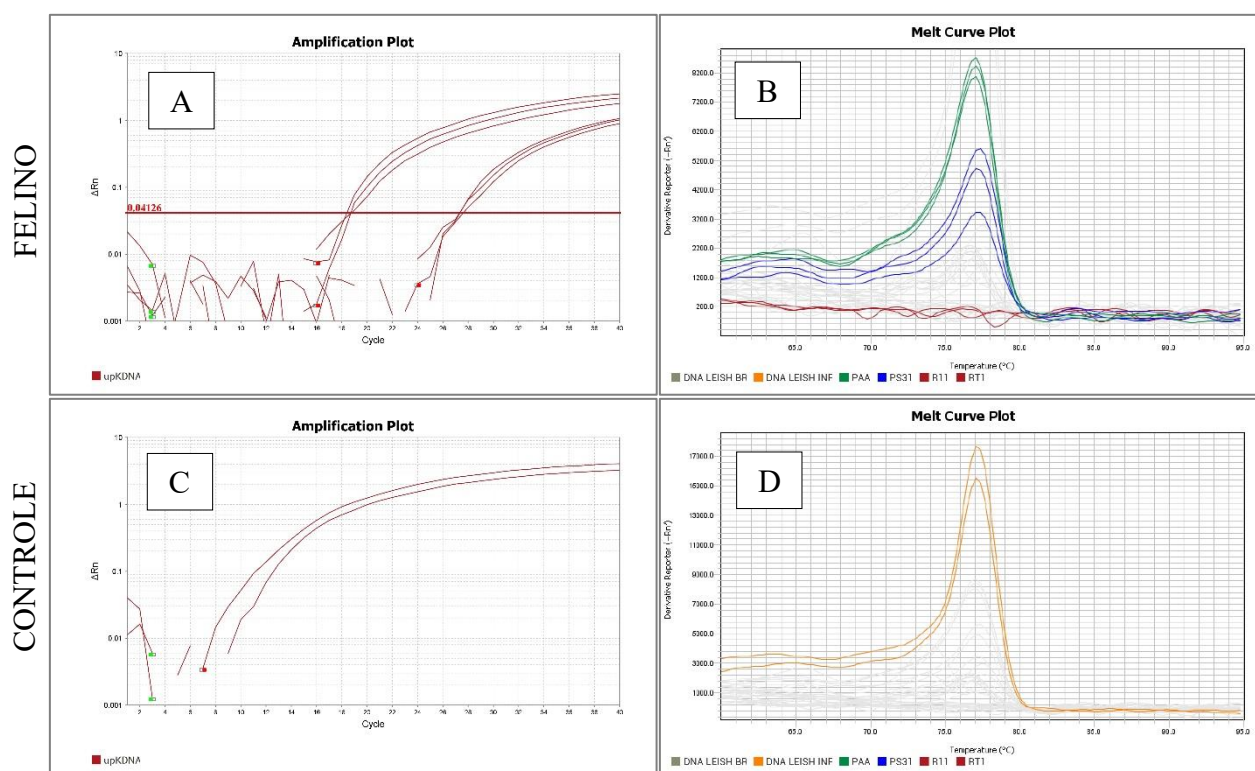


Figura 2: Amplificações de kDNA em amostras de sangue periférico e aspirado de linfonodo de paciente felino (A e B) e DNA de amostras controle de *Leishmania infantum* (C e D). As plotagens das amplificações, em escala logarítmica estão apresentadas nas imagens A e C. As curvas de *melting* dos produtos de qPCR estão apresentadas nas imagens B e D. As plotagens de *melting* dos produtos de kDNA (B) das amostras de sangue periférico e aspirado de linfonodo de paciente felino e de um felino negativo estão representadas em azul, verde e vermelho, respectivamente.

As amplificações de kDNA do parasito, obtidas a partir das amostras de sangue periférico e aspirado de linfonodo do paciente, permitiram a quantificação das cargas parasitárias utilizando curva-padrão traçada para felinos (**Figura 3**). Assim, cerca de 50.181,49 \pm 10.388,43 leishmanias/ μ L de aspirado de linfonodo (média \pm d.p.) e cerca de

31,30±5,23 leishmanias/μL de sangue periférico (média±d.p.) estavam presentes as amostras (Tabela 3).

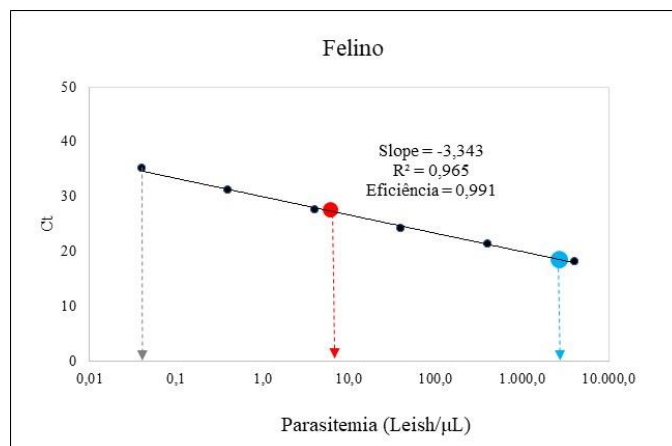


Figura 3. Curva-padrão de amplificação de kDNA de *L. infantum* por qPCR em amostras de DNA felino. A sensibilidade de amplificação (seta cinza) foi equivalente à detecção de 0,04 leishmania/μL. Os parâmetros da curva (Slope, R² e Eficiência) estão apresentados na imagem. Os valores oriundos das amplificações de amostras de DNA de sangue periférico (marcador e seta em vermelho) e de aspirado de linfonodo (marcador e seta em azul) do paciente felino estão indicados.

Tabela 2: Rendimento de DNA de amostras de sangue periférico e aspirado de linfonodo embebidas em papel de filtro oriundas de paciente felino.

Amostra	[DNA] (ng/uL)	DNA (ng)	Absorbância				R _{260/280}	R _{230/320}
			260	280	230	320		
Sangue	3,5	105,0	0,54	0,50	0,61	0,47	2,33	0,50
Aspirado linfonodo	3,5	105,0	0,11	0,07	0,17	0,04	2,33	0,54

Os resultados obtidos em ambas as amostras reforçam a elevada sensibilidade do protocolo de qPCR apresentado no presente estudo. Destaca-se ainda a elevada acurácia do protocolo, evidenciada pela estimativa de quantificação realizada com amostra padrão de DNA equivalente a 500.000 leishmania/μL, a qual teve concentração estimada em 758.251,18±44.077,67 na curva traçada para felinos.

Tabela 3. Quantificação de leishmania em amostras felinas (sangue e aspirado de linfonodo) e em amostra padrão de DNA de 500.000 leishmania/μL através de qPCR.

Parâmetro	Amostra (média±d.p.)		
	Sangue	Aspirado linfonodo	Controle positivo
Ct upKDNA	27,35±0,26	18,57±0,29	15,02±0,09
Carga Parasitária (Leishmania/μL)	31,30±5,23	50.181,49± 10.388,43	758.251,18±44.077,67

Alguns estudos, realizados no Brasil e em outros países, já relataram a detecção de *L. infantum* em felinos (PENNISI & PERSICHETTI, 2018). Nosso estudo demonstrou a adequada aplicabilidade do protocolo de detecção de DNA de *L. infantum* por qPCR desenvolvido pela UPGeM da UNIFAMETRO para amostras felinas. Destaca-se de forma especial os volumes reduzidos das mesmas (105µL para sangue e 40µL para aspirado de linfonodo) e seu transporte em condições simplificadas, à seco e em temperatura ambiente, sem uso de protetor químico de DNA. Este achado é de destacada importância, pois 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).

A compreensão do papel do gato na epidemiologia da leishmaniose visceral 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 (IATTA et al., 2019). O presente estudo fortalece perspectivas futuras de padronização de procedimentos para detecção de *L. infantum* em felinos, aliando praticidade e assertividade e viabilizando a triagem de populações de gatos para um melhor entendimento da epidemiologia da leishmaniose visceral, assim como o papel dos felinos como reservatórios do parasito.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente investigação apresenta, de forma inédita, a detecção *Leishmania infantum* em amostras biológicas de paciente felino através de PCR em tempo real (qPCR) na Unidade de Pesquisa em Genética Molecular (UPGeM) da UNIFAMETRO. A paciente, oriunda da zona urbana de Araguaína, Tocantins, apresentava sinais clínicos leves e formas amastigotas de *Leishmania* spp. nos aspirados das lesões cutâneas e de linfonodo. Através de qPCR, a carga parasitária estimada (média±d.p.) foi de 50.181,49±10.388,43 leishmanias/µL de aspirado de linfonodo e cerca de 31,30±5,23 leishmanias/µL de sangue periférico. O presente estudo demonstrou ótima aplicabilidade do protocolo de detecção de DNA de *L. infantum* por qPCR desenvolvido pela UPGeM para amostras felinas. Destacando-se de forma especial os volumes reduzidos das amostras (~40 a 100µL) e seu transporte em condições simplificadas, à seco e em temperatura ambiente, sem uso de protetor químico de DNA. O presente estudo fortalece perspectivas futuras de padronização de procedimentos para detecção de *L. infantum* em felinos, aliando praticidade e assertividade, e viabilizando a triagem de populações desses animais. As mesmas promoverão um melhor entendimento da epidemiologia da leishmaniose visceral, assim como o papel dos felinos como reservatórios do parasito.

REFERÊNCIAS

- 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.
- CHAGAS, U. M. R. *et al.* **Correlations between tissue parasite load and common clinical signs in dogs naturally infected by Leishmania infantum: review article.** Elsevier: Experimental Parasitology, São Paulo, v. 291, n. 3, p. 109-368, mar/2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109368>. Acesso em: 11 out. 2021.
- SPADA, E. *et al.* **Prevalence of Leishmania infantum and co-infections in stray cats in northern Italy.** Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, v. 45, p. 53-58, fev ./2016.
- AKHTARDANESH B, SHARIFI I, MOHAMMADI A, MOSTAFAVI M, HAKIMMIPOUR M, POURAFSHAR NG. **Feline visceral leishmaniasis in Kerman, southeast of Iran: serological and molecular study.** Journal of Vector Borne Diseases, 2017, 54(1): 96-102.
- 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.** Infection, Genetics and Evolution, 2005. 5(2): 109- 116.
- 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.
- PENNISI, M.G., PERSICHETTI, M.F. **Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog?** Veterinary Parasitology, 2018. 131–137.