



CONEXÃO UNIFAMETRO 2021

XVII SEMANA ACADÊMICA

ISSN: 2357-8645

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM PACIENTES ATENDIDOS NO CENTRO DE MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIFAMETRO

Joana Lorena de Souza Freitas

Iniciação Científica – Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

joana.freitas@aluno.unifametro.edu.br

Maria Vanessa de Oliveira Marques

Iniciação Científica – Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

mariav.marques@aluno.unifametro.edu.br

Glauciane Monteiro da Silva Sousa

Iniciação Científica – Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

glauciane.sousa@aluno.unifametro.edu.br

Luciana Magalhães Melo

Professora orientadora – Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

luciana.melo@professor.unifametro.edu.br

Claudia Maria Leal Bevilaqua

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

claudia.bevilaqua@uece.br

Helcileia Dias Santos

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

hdsantos@mail.uft.edu.br

Área Temática: Clínica e biotecnologias aplicadas em medicina veterinária.

Encontro Científico: IX Encontro de Monitoria e Iniciação Científica.

RESUMO

Introdução: A leishmaniose visceral é uma zoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e transmitida por flebotomíneos do complexo *Lutzomyia longipalpis*. A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) pode apresentar-se como doença assintomática, ou com uma série de sinais clínicos inespecíficos, como apatia, emagrecimento e lesões cutâneas de difícil cicatrização. **Objetivo:** Aplicar PCR em tempo real (qPCR) para detecção do parasito em amostras de sangue periférico de cães. **Métodos:** Pacientes caninos (n=43), atendidos no Centro de Medicina Veterinária da UNIFAMETRO, foram submetidos a exame clínico e coleta de sangue, para teste rápido de LVC e para extração de DNA total. O diagnóstico molecular foi feito através de amplificação de kDNA de *L. infantum*, bem como de mtDNA canino (controle endógeno). Informações acerca do conhecimento prévio do tutor sobre LVC foram coletadas. **Resultados:** Um total de 41,86% dos pacientes apresentou quadro clínico de debilidade, 51,16%, estado clínico bom e 6,97%, hígidez. A maioria dos tutores já tinha conhecimento prévio da patologia e adotavam medidas preventivas. Sete animais (16,27%) apresentaram resultado positivo no teste rápido e um (2,32%) apresentou resultado positivo por qPCR. O produto obtido apresentou valor de Tm similar àquele do controle positivo. Todas as amostras amplificaram mtDNA. **Conclusão:** Apenas cerca de 2,3% dos pacientes caninos atendidos no

bairro da Jacarecanga, no Centro de Medicina Veterinária da UNIFAMETRO, apresentaram resultado positivo no teste molecular para diagnóstico da LVC. A utilização de um método mais específico, como o qPCR, possibilita a exclusão de resultados falso-positivos oriundos, especialmente de reação cruzada com outros hemoparasitos.

Palavras-chave: cão; leishmaniose; qPCR; calazar; PCR em tempo real.

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). Além de bolsa de produtividade em pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico-Tecnológico (CNPq) e de doutorado da CAPES.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma zoonose de grande relevância para a saúde pública, sendo causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e transmitida por flebotomíneos fêmeas do complexo *Lutzomyia longipalpis*. *L. infantum* é o principal agente etiológico da Leishmaniose Visceral Canina, LVC (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). A fêmea do parasito tem hábitos noturnos e seus ovos são depositados em ambientes úmidos ou em matéria orgânica. No ciclo biológico do parasito, o vetor faz o repasto de sangue contendo o protozoário na forma amastigota, quando se alimenta de um animal parasitado e transmite para outros animais, por ocasião de novos repastos (ABRANCHES et al., 1998).

A LVC pode se apresentar como doença assintomática, ou com uma série de sinais clínicos inespecíficos. Cerca de 60% a 80% dos animais que vivem em áreas endêmicas podem ter contato com o parasito e não desenvolver sinais clínicos por longo tempo. Entretanto, já foi demonstrado que cães infectados assintomáticos podem transmitir a *L. infantum* para flebotomíneos, tendo um papel ativo na transmissão da doença (MOLINA et al., 1994). Apesar da ausência de sinais clínicos específicos, os mais comuns são: alterações cutâneas, linfadenomegalia local ou generalizada, perda de peso, aumento do tamanho do baço e do fígado, onicogribose e apatia (MAIA et al., 2008). Estes sinais clínicos podem sobrepor a muitas outras doenças, tornando o diagnóstico da LVC um desafio e devendo ser amparado por testes laboratoriais.

O processo de triagem de cães infectados requer métodos de diagnóstico confiáveis, visando o melhor controle epidemiológico da doença. Já existem uma vasta variedade de métodos para diagnóstico dos cães que empregam diversos antígenos. Contudo, ainda não está disponível um antígeno altamente específico e que seja empregado com um método de fácil execução. O diagnóstico molecular pela reação em cadeia da polimerase, baseado na amplificação sequências de DNA do kinetoplasto do parasito, têm-se apresentado como método promissor e de crescente utilização. Este teste pode ser realizado em diferentes amostras, tais

como aspirados de medula, linfonodos, sangue periférico, biópsias de pele e pelos (ALVAR et al., 2004). Assim, o diagnóstico molecular baseado em qPCR tem recebido mais atenção na eficácia de detecção deste parasito devido à sua sensibilidade, especificidade e flexibilidade na escolha das amostras biológicas (OLIVEIRA et al., 2020).

Nesse contexto, estudos baseados em qPCR estão sendo cada vez mais utilizados para a detecção de *L. infantum* em cães domésticos, assim como em humanos. O objetivo do presente estudo foi aplicar uma estratégia metodológica baseada em qPCR para detecção do parasito em amostras de sangue periférico de pacientes caninos atendidos no Centro de Medicina Veterinária da UNIFAMETRO.

METODOLOGIA

1. Material biológico e ética animal:

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE) em abril de 2020. Amostras de sangue periférico de pacientes caninos (n=43) atendidos no Centro de Medicina Veterinária da UNIFAMETRO, no mês de junho de 2021 foram utilizadas na investigação.

2. Avaliação clínica dos pacientes e conhecimentos prévios dos tutores

Os pacientes foram submetidos a exame clínico completo, incluindo inspeção geral dermatológica, oftalmológica, de cavidade oral e sinais sistêmicos. Dados clínicos do paciente relevantes para a pesquisa e informações acerca do conhecimento prévio do tutor sobre LV foram coletados em formulários específicos. Foram realizadas coletas de sangue periférico através de venopunção cefálica e jugular. As amostras foram armazenadas a -20°C até processamento na Unidade de Pesquisa em Genética Molecular (UPGeM) da UNIFAMETRO.

3. Teste rápido para diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina

Todos os cães passaram por triagem para LVC através de teste sorológico rápido imunocromatográfico DPP (Teste Rápido-Dual Path Platform, Alere, EUA), utilizando-se $10\mu\text{L}$ de sangue e seguindo-se as orientações do fabricante. O procedimento foi realizado com uma pipeta plástica descartável na posição vertical foi dispensada uma gota no poço do teste. Depois da completa absorção da amostra, foram adicionadas 2 gotas de tampão diluente.

4. Extração de DNA:

As extrações de DNA foram realizadas utilizando o Purelink Genomic DNA Mini kit (Invitrogen, USA). O sangue canino ($200\mu\text{l}$), foi acrescido de $20\mu\text{L}$ de Proteinase K e $20\mu\text{L}$ de RNase A (20 mg/mL) e incubado por 2min. Após adição de $200\mu\text{L}$ de Purelink Genomic Lysis

Buffer, incubação por 10 min a 55°C e adição de 200µL de etanol a 100%, o volume total foi transferido para a resina e centrifugado a 10.000 ×g por 1min. A resina foi lavada duas vezes e cada amostra de DNA foi eluída com 50µL de água livre de nucleases. Uma segunda eluição foi realizada para cálculo de rendimento de DNA total. O DNA foi quantificado por espectrofotometria com Picodrop (Picodrop, UK).

5. Reações de PCR em tempo real (qPCR):

Cada reação de amplificação por RT-PCR 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.

6. Diagnóstico molecular de LVC

As detecções de *L. infantum* no sangue periférico dos cães foram realizadas reações de qPCR para amplificação do DNA de kinetoplasto (kDNA) do parasito, utilizando os primers upkDNA-SE e upkDNA-AS (OLIVEIRA et al. 2019). Os controles das reações foram feitos através da amplificação de gene endógeno, mtDNA canino, utilizando os primers Dogmt1-SE e Dogmt1-AS (PEREIRA et al., 2019). DNA de *L. infantum* (10.000.000 leish/µL) foi utilizado como controle exógeno. Os parâmetros de Eficiência, Linearidade (R^2) e especificidade das amplificações dos primers para kDNA e mtDNA foram previamente descritas por OLIVEIRA et al. 2019 e PEREIRA et al., 2019, respectivamente.

6. 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 rendimento de DNA, bem como de Ct (*Threshold cycle*) e Tm (*Melting temperature*) foram expressos em média ±e.p.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diagnóstico da leishmaniose é realizado a partir do exame clínico, dados epidemiológicos e técnicas laboratoriais, que se constitui por métodos: parasitológico, imunológico e molecular (ALVES E BEVILACQUA, 2004). Atualmente, as técnicas

diagnósticas moleculares vêm sendo utilizadas como ferramenta para detecção de leishmania em amostras clínicas de humanos e animais, uma vez que a sintomatologia dos pacientes é variável.

Na presente investigação, por ocasião do exame clínico dos pacientes (**Tabela 1**), foi possível constatar que 41,86% (18/43) apresentaram sinais clínicos indicativos de debilidade como apatia, febre, diarreia e êmese. Os demais animais encontravam-se em estado clínico bom (51,16%) ou plenamente hígidos (6,97%).

Diferentes metodologias vêm sendo utilizadas para diagnóstico das leishmanioses, como métodos sorológicos, imunoabsorção enzimática (ELISA) etc. No entanto, as abordagens sorológicas possuem a limitação oriunda de possibilidade de reação cruzada (SRIVIDYA, et al., 2012). Assim, a existência de outras patologias acometendo o paciente podem levar a presença a resultados falso-positivos nos testes (ELMAHALLAWY et al., 2014). Avanços constantes na biologia molecular permitiram seu uso crescente como uma ferramenta no diagnóstico do calazar, com as vantagens de alta sensibilidade e especificidade.

No presente trabalho, um total de sete (16,27%) pacientes apresentaram resultados positivos no teste rápido DPP para leishmaniose visceral. Os demais animais (36/43, 83,72%) apresentaram resultado negativo no referido teste (**Tabela 1**).

Tabela 1: Dados gerais de pacientes caninos e seus resultados para teste imunocromatográfico para LVC e qPCR para detecção de *L. infantum*.

Parâmetro		Total de pacientes (%)
Sexo	Fêmea	25 (58,13%)
	Macho	18 (41,86%)
Estado geral	Hígido	3 (6,97%)
	Bom	22 (51,16%)
	Debilidade	18 (41,86%)
DPP	+	7 (16,2%)
	-	36 (83,72%)
qPCR	+	1 (2,32%)
	-	42 (97,67%)

Enquanto, a partir do teste de qPCR para detecção de kDNA no sangue periférico (**Tabela 2**), apenas um paciente (2,32%) apresentou resultado positivo (**Figura 2A**), com Ct de $24,77 \pm 0,04$ (média \pm e.p.). O produto de amplificação obtido apresentou valor de Tm de $75,07 \pm 0,00$ (média \pm e.p.), similar àquele obtido para o controle positivo de DNA de *L. infantum*, $75,54 \pm 0,18$ (média \pm e.p., **Figura 2B**). Adicionalmente, todas as amostras negativas

apresentaram CT de $34,26 \pm 0,11$ (média \pm e.p.) para kDNA, e ausência de pico de *melting*, indicando a ausência de produto específico (**Figura 2C**).

Tabela 2: Parâmetros de amplificação de DNA mitocondrial canino e de kinetoplasto de *L. infantum* no diagnóstico molecular da LVC.

Paciente/amostra	mtDNA (Média \pm e.p.)		upkDNA (Média \pm e.p.)	
	Ct	Tm	Ct	Tm
Cão negativo			$34,26 \pm 0,11$	NA
Cão positivo	$15,85 \pm 0,14$	$77,90 \pm 0,04$	$24,77 \pm 0,04$	$75,07 \pm 0,00$
DNA Leishmania	NA	NA	$13,10 \pm 0,62$	$75,54 \pm 0,18$

NA: Não se aplica.

No estudo realizado, o rendimento de DNA total das amostras foi de $2,28 \mu\text{g} \pm 0,23$ (média \pm e.p.), com valores de $R_{260/280}$ de $1,83 \pm 0,06$ (média \pm e.p.). Apesar desses valores terem sido homogêneos e apropriados, dois pacientes (n.24 e n.50) falharam em amplificar o mtDNA. As demais apresentaram Ct para mtDNA no valor de $15,85 \pm 0,14$ (média \pm e.p.), indicando qualidade apropriada dos ácidos nucleicos, bem como realização correta dos procedimentos técnicos (**Figura 2**).

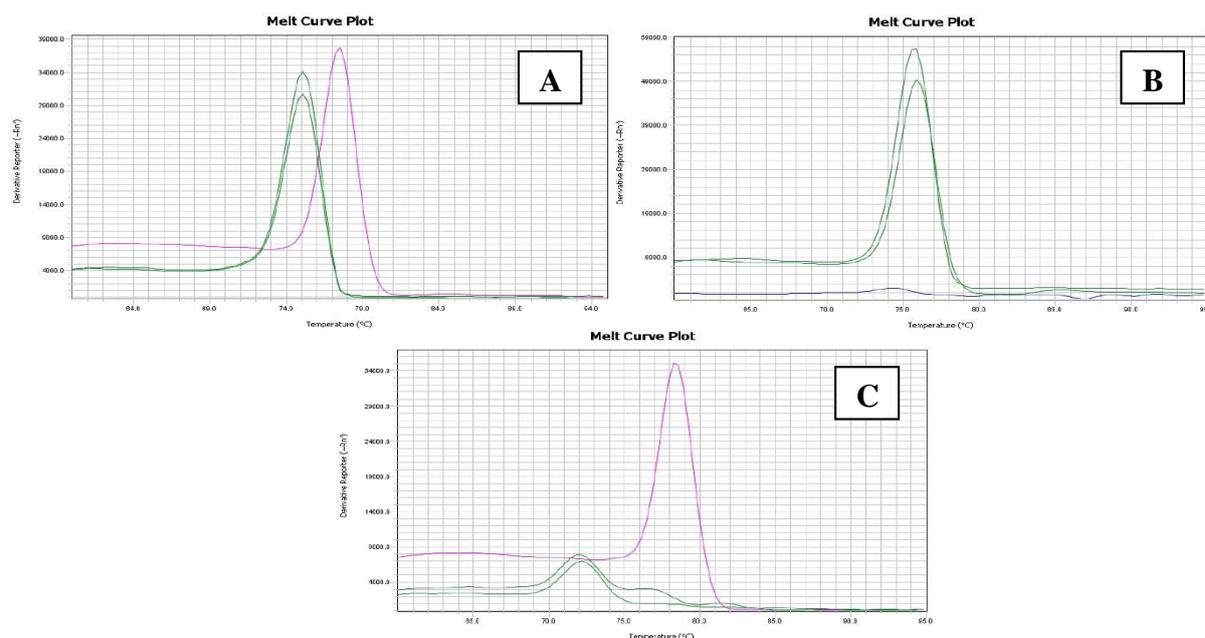


Figura 2: Diagnóstico molecular de *L. infantum* em pacientes caninos. A) Paciente canino positivo. B) Controle positivo exógeno (DNA de *L. Infantum*). C) Paciente canino negativo. Curva de *melting* dos amplicons obtidos por qPCR para amplificação de kDNA (verde) e mtDNA canino (rosa). Controle negativo com água em azul.

Atualmente abordagens com uso de PCR tempo real (qPCR) vêm sendo ferramentas importantes no diagnóstico molecular da LVC, podendo utilizar amostras clínicas como: sangue, soro, fragmentos de pele, medula óssea, líquido, amostra conjuntival e aspirado de linfonodo (QUARESMA et al., 2009).

Finalmente, no inquérito realizado através do preenchimento de fichas com respostas dos tutores acerca do conhecimento prévio sobre a LVC (**Figura 1**), constatou-se que 97,67% (42/43) conheciam ou ouviram falar sobre a patologia. Desses, quatro tutores (9,30%) já tiveram pets acometidos pela LVC em suas residências. Os tutores informaram ainda que não fizeram tratamento medicamentoso dos animais, tendo sido realizada a eutanásia dentro do programa de controle de zoonoses do município de Fortaleza. O inquérito mostrou também que 74,4% dos tutores adotam medidas preventivas de combate a leishmaniose canina através de cuidados com o animal (como uso de coleiras repelentes). Cerca de 51,2% deles, realizavam ações no ambiente, como remoção de lixo e matéria orgânica nos peridomicílios. Aproximadamente 72,1% dos tutores também adotavam medidas baseadas em ações, como restrição de horário de passeio com os animais.

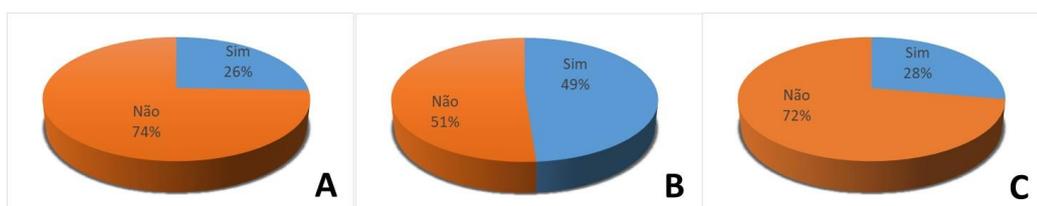


Figura 1: Inquérito sobre medidas preventivas no combate à leishmaniose visceral (LV) realizadas pelos tutores, (A) com foco no animal, (B) com foco no ambiente e (C) com foco em ações do tutor.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apenas cerca de 2,3% dos pacientes caninos atendidos no bairro da Jacarecanga, no Centro de Medicina Veterinária da UNIFAMETRO, apresentaram resultado positivo no teste molecular para diagnóstico da leishmaniose visceral canina. A utilização de um método mais específico para o diagnóstico dessa patologia, como o qPCR, possibilita a exclusão de resultados falso-positivos oriundos, especialmente de reação cruzada com outros hemoparasitos. Finalmente, o método de qPCR também podem ser utilizados para quantificar a carga parasitária, sendo útil no monitoramento de pacientes caninos em tratamento. Estudos adicionais com diferentes tipos de amostras biológicas podem ainda ser úteis para minimizar os possíveis resultados falso-negativos e a invasividade da coleta.

REFERÊNCIAS

ABRANCHES P; CAMPINO, L. *et al.* Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis. **Acta Médica Portuguesa**, v. 10, p. 5-871, out./1998.

ALVAR, J. *et al.* Canine leishmaniasis. **The journal of Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemiologia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, n.1, p.259-265, 2004.

ELMAHALLAWY, E.K. *et al.* Diagnosis of leishmaniasis (review). **Journal of Infection in Developmental Countries**, v.8, n.8, p.961-972, 2014.

MAIA C, CAMPINO L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Elsevier: Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 87-274, dec./2008.

MOLINA, R. *et al.* Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 88, n. 4, p. 3-491, ago./1994.

OLIVEIRA, J. V. D. *et al.* **Detecção de *Leishmania infantum* em amostras de swab ocular felino através de PCR em tempo real: validação metodológica.** Conexão Unifametro 2020: Clínica e biotecnologias aplicadas em medicina veterinária, Fortaleza, p. 1-1, nov./2020. Disponível em: <https://doity.com.br/anais/conexaounifametro2020/trabalho/169021>. Acesso em: 11 out. 2021.

OLIVEIRA, M. T. D. *et al.* **Amplificação de DNA mitocondrial canino para diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral por PCR em tempo real.** Conexão Unifametro 2019: Clínica e biotecnologias aplicadas em medicina veterinária, Fortaleza, p. 6-6, nov./2019. Disponível em: <https://doity.com.br/anais/conexaounifametro2019/trabalho/123781>. Acesso em: 11 out. 2021.

PEREIRA, F. I. R. *et al.* **Amplificação de DNA mitocondrial canino para diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral por PCR em tempo real.** Conexão Unifametro 2019: Clínica e biotecnologias aplicadas em medicina veterinária, Fortaleza, p. 6-6, nov./2019. Disponível em: <https://www.doity.com.br/anais/conexaounifametro2019/trabalho/123761>. Acesso em: 11/10/2021.

SOLANO-GALLEGO L. *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and sorology. **Journal Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 560, fev./2011.

SRIVIDYA, G. *et al.* Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitology research**, v.110, n.3, p.1065-78, 2012.

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, p.289-294, 2009.