



DETECÇÃO DE DNA DE *LEISHMANIA* POR PCR A PARTIR DE AMOSTRA FIXADA EM
CARTÃO FTA

Fernanda dos Santos Rolim¹
Gessilí Santana²
Maria Lucia Rossetti³

Resumo

As leishmanioses estão entre as doenças mais negligenciadas do mundo. Pertencem a um grupo de doenças causadas por mais de 18 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. A transmissão ocorre através da picada do fletobomíneo. O hospedeiro do protozoário pode ser o homem ou o cão. O animal pode ir a óbito em poucas semanas de acordo com a evolução da doença. As técnicas usadas para o diagnóstico de leishmaniose são variadas, desde métodos rápidos como imunocromatográficos até métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Uma forma alternativa para transporte de amostras clínicas para o diagnóstico de leishmaniose por PCR, escolhida para avaliação neste estudo foi o cartão FTA Classic Cards, pois quando utilizado para outras enfermidades proporcionou facilidades no transporte, armazenamento e no manuseio das amostras. Além disso, outra vantagem do cartão seria que a própria coleta de sangue poderia ser através de punção digital, método menos invasivo que outras técnicas. Esse cartão possui um filtro impregnado, com alguns componentes químicos que produzem a lise das membranas celulares por desnaturação protéica, o que elimina o poder infectocontagioso dos microorganismos, e ao mesmo tempo os ácidos nucleicos são retidos no cartão e estabilizados para o armazenamento em temperatura ambiente. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar por PCR a eficácia da extração de DNA de *Leishmania* de plasma e sangue de caninos fixados no cartão comercial FTA.

Palavras-chave: Leishmaniose; Classic Card; Extração.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses estão entre as doenças mais negligenciadas do mundo. Estima-se que a cada ano 1,3 milhões de novos casos e entre 20 000 e 30 000 mortes ocorreram (OMS, 2015). Pertencem a um grupo de doenças causadas por mais de 18 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. A transmissão ocorre através da picada do fletobomíneo. Existem mais de 900 espécies de fletobomíneos, sendo que 70 estão envolvidas na transmissão da *Leishmania sp* (READY, 2013). O hospedeiro do protozoário pode ser o homem ou o cão, de acordo com seu ciclo de vida (BRASIL, 2014).

O aspecto clínico da leishmaniose no homem pode apresentar diferentes formas: cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral. A leishmaniose visceral (LV), conhecida como calazar, é a forma mais letal, por haver o comprometimento dos órgãos internos. É caracterizada por manifestações clínicas como febre alta, perda de peso, anemia, aumento do baço e do fígado. A leishmaniose visceral canina (LVC), tem evolução lenta e o cão

¹ Aluno do curso de graduação em Farmácia – Bolsista PIBIC/CNPq – fernandarolim97@gmail.com

² Aluno do curso de Pós-Graduação em Biologia celular e Biologia Molecular Aplicada à Saúde– Bolsista PIBIC-EM/CNPq – gessilisantana@yahoo.com.br

³ Professor do curso de Farmácia/Biomedicina e PPG biosaúde – mrossett@terra.com.br

pode desenvolver a forma aguda ou crônica. A frequência de sinais observados nos cães são o emagrecimento, surgimento de lesões cutâneas, úlceras na pele, entre outros. O animal pode ir a óbito em poucas semanas de acordo com a evolução da doença (ROELFSEMA et al., 2011; BRASIL, 2014).

Um estudo realizado no Brasil concluiu que o tratamento nos cães não elimina completamente os parasitas, apenas promove a cura clínica, sendo estes ainda possíveis fontes de infecção (Ikeda-Garcia et al., 2010). Dessa forma, uma das recomendações para o controle de infecção, regulamentado pelo Decreto Federal nº 51.838, de 14 de março de 1963, é a eutanásia nos cães soropositivos para *Leishmania sp.* Além da eutanásia, é indicado também para o controle de infecção, o controle de vetores por inseticidas e o tratamento de casos humanos.

O diagnóstico de *Leishmania* pode ser realizado por diferentes métodos como parasitológico, sorológico e molecular. Onde os métodos moleculares como PCR e PCR quantitativo tem se mostrado bastante promissores (TAYLOR, COOP & WALL, 2010; GOTO et al., 2006). Assis et al. (2010) demonstraram os índices de positividade dos métodos PCR, ELISA, imuno-histoquímica (IMIQ), RIFI e histoquímica (HE) para o diagnóstico da LVC, que foram de 97%, 65%, 62%, 56% e 56%, respectivamente. O PCR foi o método que apresentou maior positividade, sendo o mais sensível e preciso para o diagnóstico definitivo da LVC. O PCR em tempo real tem sido muito utilizado pois elimina necessidade do processo pós-amplificação (eletroforese), que é necessário para a detecção da amplificação no PCR convencional. Além disso, diminui os riscos de contaminação que causariam falsos positivos (Maia e Campino, 2008; Paiva-Cavalcanti et al., 2009). No entanto, poucos são os laboratórios que realizam esta metodologia, o que exige que as amostras coletadas em regiões rurais e distantes sejam transportadas para grande centros, o que dificulta e praticamente inviabiliza o procedimento. Uma forma alternativa que tem sido descrita para coleta e transporte de amostras biológicas é fazer uso de cartão filtro como FTA (Whatmann), que utiliza um papel filtro impregnado com componentes químicos, que produzem a lise das membranas celulares por desnaturação protéica, eliminando o poder infectocontagioso dos microorganismos (WOLFGRAMM et al., 2009; PULIDO-LANDÍNEZ et al., 2012). Os ácidos nucleicos são retidos com facilidade no cartão, onde permanecem estáveis para o transporte, processamento imediato ou armazenamento em temperatura ambiente a longo prazo. Os cartões FTA foram desenhados para o transporte de amostras, que posteriormente servirão para extração de DNA ou RNA que serão utilizados em testes de análises moleculares como em reações de PCR. As amostras armazenadas no cartão apresentam alta qualidade de DNA e cada amostra pode ser utilizada como molde para 20 a 30 reações de PCR, permitindo a realização de diagnósticos rápidos, precisos e com aplicações em diferentes áreas (Beckett et al., 2008). O diagnóstico precoce e eficaz ainda é a melhor forma de controle da doença.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a eficácia de amplificação de DNA de *Leishmania* a partir de amostras de sangue de caninos em papel FTA em comparação com uma extração de rotina.

METODOLOGIA

As amostras

Para a padronização dos ensaios de PCR, foram utilizadas amostras de sangue (plasma) de caninos com resultado conhecido nos testes sorológicos para leishmaniose, provenientes do Laboratório Central (LACEN) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

do Rio Grande do Sul (FEPPS/RS), que é referência no Estado do Rio Grande do Sul, no Brasil, para este diagnóstico. Essas amostras eram provenientes de caninos suspeitos de LV de centros de controles de zoonoses e vetores, canis municipais, clínicas e, ainda, laboratórios de todo o Estado. O diagnóstico de LV foi definido conforme protocolo recomendado pelo Ministério da Saúde (Brasil). A nota técnica nº 01/2011-CGDT/CGLAB/DEVIT/SVS/MS) determina o Teste rápido (TR DPP® Leishmaniose Visceral) para triagem e ELISA para confirmatório (BRASIL, 2011).

Extração de DNA das amostras de plasma canino

O isolamento de DNA foi realizado através do método comercial para purificação de ácidos nucleicos, Kit Nucleid Acid and Protein Purification (Macherey-Nagel).

Extração de DNA das amostras de plasmas canino fixadas em cartão

As amostras positivas foram fixadas no cartão FTA classic e a extração de DNA das amostras de plasma foi realizada através do kit WhatmanTM FTATM Cards (Ge Healthcare Life Sciences).

Amplificação por PCR em tempo real

Foram utilizados os primers conforme descrito por Rodgers et al. (1990). A amplificação teve como alvo uma região de 120 pb de minicírculos do gênero *Leishmania*. Essas sequências de DNA estão presentes em cópias múltiplas em uma região conservada dos minicírculos de DNA do Cinetoplasto (kDNA).

A amplificação por PCR em tempo real foi realizada em um termociclador StepOne Real Time PCR Systems (AB Applied Biosystems) e os produtos amplificados foram detectados por meio do marcador (fluoróforo) SYBR® Green. A reação foi padronizada em um volume final de 20 µL, contendo 15 µL de Fast SYBR® Green master mix, 10 pmol de cada primer e 5 µL de DNA extraído de soro canino. As condições da amplificação foram: ativação da enzima a 95°C por 20 segundos, desnaturação a 95°C por 1 segundo e, por fim, anelamento e extensão a 61°C por 20 segundos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento foi realizada a padronização da reação de PCR em tempo real com 100 amostras de plasma de caninos com diagnóstico de leishmaniose positivo e negativo e com DNA extraídos com a técnica Kit Nucleid Acid and Protein Purification.

O PCR confirmou 35 amostras das 50 consideradas positivas nos testes sorológicos. Das 50 negativas, 45 foram também negativas no PCR e 5 foram positivas.

36 amostras positivas em todos os testes foram aplicadas no cartão e estão armazenadas para serem processadas no PCR em tempo real.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo busca contribuir para a melhora do diagnóstico de leishmaniose em cães buscando formas que facilitem a coleta de sangue de animais e também facilite o transporte de DNA para laboratórios especializados em técnicas moleculares.

REFERÊNCIAS

ASSIS, J.; QUEIROZ, N.M.G.P.; SILVEIRA, R.C.V.; NUNES, C.M.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; JUNIOR, A.C.F.N.; NEVES, M.F.; MACHADO, R.Z.; BUZETTI, W.A.S. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Rev. Bras. Parasitol.** v. 19, p. 17-25, 2010.

BECKETT, S.M.; LAUGHTON, S.J.; POZZA, L.D.; MCCOWAGE, G.B.; MARSHALL, G.; COHN, R.J.; MILINE, E.; ASTHON, L.J. Buccal swabs and treated cards: methodological considerations for molecular epidemiological studies examining pediatric populations. **Am. J. Epidemiol.** v. 167, p. 1260-7, 2008.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília: MS, p.120, 2014.

HANSEN, T.V.O.; SIMONSEN, M.K.; NIELSON, F.C.; HUNDRUP, Y.A. Collection of blood, saliva, and buccal cell samples in a pilot study on the danish nurse cohort: Comparison of the response rate and quality of genomic DNA. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 16, p. 2072-6, 2007.

IKETA-GARCIA, F.A.; LOPES, R.S.; MARQUES, F.J.; CIARLIN, P.C.; LIMA, V.M.F.; MORINISHI, C.K.; ZANETTE, M.F.; PERRI, S.H.V.; MARCONDES, M. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate and allopurinol. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v. 47, p. 218-23, 2010.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet. Parasitol.** v. 158, p. 274-87, 2008.

PAIVA-CAVALCANTI, M.; MORAIS, R.C.S.; PESSOA-E-SILVA, R.; TRAJANO-SILVA, L.A.M.; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S.C.; TAVARES, D.H.C.; BREALAZ-DE-CASTRO, M.C.A.; SILVA, R.F.; PEREIRA, V.R.A. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell Biosci.** v. 3, p. 10, 2015.

PARAIVA-CAVALCANTI, M.; BRITO, M.E.F.; SOUZA, W.V.; GOMES, Y.M.; ABATH, F.G.C. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **Vet J.** v. 182, p. 356-8, 2009.

PULIDO-LANDÍNEZ, M.; LAVINIKI, V.; SÁNCHEZ-INGUNZA, R.; GUARD, J.; NASCIMENTO, V.P. Uso dos cartões FTA para o transporte de amostras de DNA de *Salmonella* spp. Isoladas de produtos avícolas do Sul do Brasil. **Acta Sci Vet.** v. 40, p. 1073, 2012.

READY, P.D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Diase Agents. **Rev.Entomol.** v. 58, p. 227-50, 2013.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Exp Parasitol.** v. 71, p. 267-75, 1990.

ROELFSEMA, J.H.; NOSORI, N.N.; HERREMANS, T.; KORTBEEK, L.M.; PINNELI, E. Evaluation and improvement of two PCR target in molecular typing of clinical samples of *Leishmania* patients. **Exp Parasitol.** v. 127, p. 36-41, 2009.

TAYLOR, M.A.; R. L.; WALL, R.L. **Parasitologia Veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 768, 2010.

WOLFGRAMM, E.V.; CARVALHO, F.M.; AGUIAR, V.R.C.; SARTORI, M.P.N.; HIRSCHFELD-CAMPOLONGO, G.C.R.; TSUTSUMIDA, W.M.; LOURO, I.D. Simplified buccal DNA extraction with FTA® Elute Cards. **Forensic Sci Int Genet.** v. 3, p. 125-7, 2009.

WHO. **WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Leishmaniasis. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog?term=Experimental%20parasitology%5BTitle%5Dhtml>>>. Acesso em 29 Mai. 2016.