



IMPLEMENTAÇÃO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL

Vinicius Proença da Silveira¹

Patrícia de Freitas Salla²

Nilo Ikuta³

Vagner Ricardo Lunge³

Resumo

A leishmaniose é uma doença causada por um protozoário do gênero *Leishmania*, parasita de células do sistema fagocitário mononuclear. Este parasito é transmitido pelo mosquito-palha (*Lutzomyia spp.*) que, durante o repasse sanguíneo, inocula o agente em um hospedeiro suscetível (homem, cão, etc.). A doença pode apresentar duas formas clínicas: a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), caracterizada por lesões cutâneas causadas por uma diversidade de espécies (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. lindenberg*, *L. shawi* e *L. amazonenses*), e a Leishmaniose Visceral (LV), que apresenta sinais sistêmicos com comprometimento de órgãos e é causada por apenas duas espécies (*L. donovani* e *L. infantum*). Estes parasitas possuem um ciclo epidemiológico silvestre, com canídeos silvestres e marsupiais sendo reservatórios, e um ciclo peridomiciliar, onde o cão doméstico participa como principal reservatório. Casos de LV no homem têm sido registrados nos estados do Norte do Brasil, normalmente em populações de baixa renda e próxima a zonas rurais, tendo crianças como indivíduos mais suscetíveis. Mais recentemente, casos têm sido reportados no Rio Grande do Sul (principalmente na região metropolitana de Porto Alegre) e associados à ocorrência mútua em cães domésticos (reservatórios). O atual trabalho tem como objetivo a implementação de técnica de diagnóstico molecular de LV. As amostras para o estudo foram obtidas de laboratórios veterinários. Estudos *in silico* permitiram a identificação de região genética específica de LV, sendo selecionados *primers* e sonda para análise pela técnica de TaqMan PCR. O sistema foi inicialmente utilizado na análise de amostras previamente analisadas de laboratórios veterinários, demonstrando amplificação em diluições seriadas de amostras LV positivas e ausência de amplificação na análise de outros patógenos. Este teste será utilizado na análise de amostras de cães com suspeita LV da rotina do Hospital Veterinário da ULBRA, clínicas veterinárias, canis públicos/privados e ONG's.

Palavras-chave: Diagnostico molecular; Mosquito-palha; Epidemiologia; *Leishmania spp.*

¹ Aluno de Medicina Veterinária da ULBRA – Bolsista CNPq – vinicius-dasilveira@hotmail.com

² Aluna de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

³ Professor do curso de graduação Medicina Veterinária, e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – vagner.lunge@gmail.com

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma enfermidade causada por um protozoário pertencente à família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*, trata-se de um parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com uma forma flagelada (promastigota), encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada (amastigota) nos tecidos dos vertebrados (CARVALHO et al., 2007).

O grupo da leishmaniose visceral (LV) é composto pelos parasitas do complexo *Leishmania donovani*, que compreende *L. donovani* e *L. infantum*. Nas Américas o agente etiológico é *L. infantum*, enquanto que na Europa, Ásia e África os agentes responsáveis são *L. infantum* e *L. donovani*. No Brasil, ainda se utiliza, por alguns autores, a nomenclatura *L. chagasi*, porém esta é considerada semelhante a *L. infantum* em análises bioquímicas e moleculares. (DE SOUZA et al.,2014; MACHADO et al.,2007; FOCACCIA et al., 2010). O parasito é transmitido por insetos dípteros denominados flebotomíneos, conhecidos popularmente por mosquito-palha, que veiculam as formas promastigotas do parasito, de animais infectados para animais susceptíveis, ou para o homem. Esses vetores pertencem a espécies do gênero *Lutzomyia*, dentre as quais *L. longipalpis* e *L. cruzi* são encontradas no Brasil (IKEDA-GARIA et al., 2007).

A infecção ocorre quando as fêmeas dos dípteros, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos e monócitos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. Estes sofrem divisão binária, multiplicando e diferenciação em formas promastigotas, as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo. O ciclo biológico completa-se com a picada do flebotomo infectado e a inoculação das formas promastigotas do parasito na corrente sanguínea de um novo hospedeiro vertebrado susceptível. As formas infectantes são liberadas na epiderme do hospedeiro e englobadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, se diferenciam em amastigotas e multiplicam-se até o rompimento da célula, ocorrendo à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos, ocorrendo então a disseminação para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (IKEDA-GARCIA et al.,2007; KRAUSPENHAR et al.,2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os cães domésticos e diversas espécies de animais silvestres são reservatórios naturais, garantindo a circulação das diferentes espécies de *Leishmania* na natureza. Em geral, cães são a principal fonte de infecção nas áreas urbanas, enquanto raposas e marsupiais consistem importantes focos nos ambientes silvestres. Nas Américas, a leishmaniose é considerada uma zoonose primária de mamíferos silvestres. O homem só adquire a infecção ao entrar em contato com as áreas florestais onde existem os vetores deste parasito (BRASIL, 2005; BASANO et al., 2004).

A LV humana é uma patologia endêmica de regiões tropicais, subtropicais e temperadas, ocorrendo em 98 países, com um alto número de óbitos anualmente. Na América latina o Brasil relata quase 90% dos casos sendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste responsável por alto índice de casos, a *Leishmania* tem um caráter rural devido a presença do vetor, mas recentemente vem sendo notificada e confirmada em áreas urbanas e expandindo para outras regiões do país (BRASIL, 2014). O estado do Rio Grande do Sul era considerado livre da LV até o ano de 2007, relatando somente casos provenientes de regiões endêmicas. No ano de 2008, o município de São Borja diagnosticou um cão positivo para *Leishmania*. Já nos anos seguintes (2009 a 2012), foram registrados 21 casos de LV humana, sendo sete casos autóctones do município de São Borja, dois de Itaqui, um de Uruguaiana e dois importados de outros estados do país. O vetor *L. longipalpis* foi capturado nos municípios de Barra do Quaraí, Garruchos, Porto Xavier, Pirapó, Uruguaiana, Itaqui e São

Borja. Santa Cruz do Sul e Porto Alegre eram municípios com ocorrência de LV em cães, mas sem ocorrência de *L. longipalpis* (SECRETARIA DE SAÚDE-RS, 2014). A partir de 2010, foram notificados casos de LV canina em Porto Alegre, principalmente nos bairros Lajeado, Agronomia, Lomba do Pinheiro e Morro Santana. O vetor foi detectado em 2016 e 2017, além de três casos em humanos com óbito.

Estudos de surtos urbanos demonstram a importância dos reservatórios caninos na manutenção desta doença, relatando em algumas áreas a presença da enfermidade em cães, antecedendo o aparecimento da doença humana (DE SOUZA et al., 2014). Esse fato demonstra a necessidade do reconhecimento de animais reservatórios infestados e das respectivas manifestações clínicas como formas essenciais para a adoção de medidas de controle da doença no Brasil (BRASIL, 2005). O presente projeto tem como objetivo implementação de metodologias de diagnóstico molecular, em PCR-Real Time, para a investigação e caracterização molecular da ocorrência de infecção pelos agentes etiológicos da LV (*L. donovani* e *L. infantum*) em animais reservatório no Estado do Rio Grande do Sul.

METODOLOGIA

Estudo *in silício*

Com o propósito de localizar uma região genômica conservada do protozoário *Leishmania infantum*, foi realizado uma revisão bibliográfica e selecionado *primers* específicos para a espécie. Estes *primers* foram comparados *in silico*, através de um alinhamento de amostras brasileiras disponíveis no Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI), aplicando os *softwares* de bioinformática AliView version 1.18.1 e DNASTAR's MegAlign.

Deteção e Quantificação por PCR em Tempo Real

A implementação do teste de detecção de LV foi realizada com a extração de DNA total pela metodologia de sílica, utilizando o kit comercial NewGene (Symbios Biotecnologia, Cachoeirinha – Brasil). A amplificação foi realizada com o par de *primers* LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCTCCGGGTAG- 3') e LEISH-2 (5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3'), juntamente com a sonda TaqMan-MGB (FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-MGB) (FRANCINO et al., 2006). As condições de amplificação estabelecidas no termociclador (StepOnePlus™ Real-Time PCR System) foram de um ciclo de 95 ° C durante 3 min, seguido de 40 ciclos a 95 ° C durante 15 s e 60 ° C durante 1 min.

As reações de amplificação foram estabelecidas por ensaio laboratorial de análise de DNA de LV com cascata de diluição de base 10. As amostras foram amplificadas empregando um Mix de reações, juntamente com os *primers*, previamente elaborado e as condições de amplificação foram as estabelecidas pelo estudo de FRANCINO et al. (2006).

Comissão de Ética no Uso de Animais da Ulbra (CEUA/ULBRA)

O projeto foi submetido à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da ULBRA, antes da realização das coletas amostrais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo *in silício*

A análise *in silício* das sequências de *Leishmania ssp.* brasileiras presentes no banco de dados Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI), resultou no alinhamento de 26 sequências de DNA da região do kinetoplast minicircle, 13 *leishmania infantum*, 6 *leishmania chagasi* e 7 *leishmania donovani*. Entre os estudos avaliados para determinação

dos *primes*, Fancino et al., 2006 descreveu a utilização de *primes* que apresentavam maior especificidade quando localizados *in silico* no alinhamento das sequências brasileiras, sendo a região de amplificação conservada entre as espécies do protozoário. Barragán et al. (2016), também realizou uma análise *in silico* utilizando *primes* de estudos anteriores, porém os *primes* não foram específicos para as 26 sequências analisadas neste trabalho. Foi adquirido o kit de *primes* de Fancino et al., 2006, para a realização da amplificação através do PCR-real time, devido à sua maior especificidade e assim uma detecção precisa, inclusive nos animais assintomáticos e com baixa carga parasitária.

Otimização das reações por PCR em tempo real

Para a avaliação inicial dos *primes* utilizados nos estudos, descritos por Fancino et al. (2006), foi elaborado um ensaio laboratorial, ao qual, se utilizou uma amostra de sangue sabidamente positiva para leishmaniose *cycle threshold* (Ct) de 22,94 em duplicata, realizando uma cascata de diluição de base 10, uma amostra positiva para Cinomose também em diluição de base 10, e um controle negativo. Como resultado da amplificação obtiveram-se valores positivos para as amostras de leishmaniose com Ct de 14,7 para o concentrado, Ct de 18 para a primeira diluição (10x), Ct de 21,6 para a segunda diluição (100x) e Ct de 24,8 para a última diluição (1000x), em todas as diluições o deslocamento de Cts foi coerente. A amostra de Cinomose, negativou para o concentrado e para as diluições, assim como o esperado para o controle negativo.

Comissão de Ética no Uso de Animais

Este estudo foi submetido à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da ULBRA, para realização do início das coletas de material biológico em cães atendidos na rotina de Hospitais Veterinários (ULBRA, UFRGS), de canis municipais e ONG's das regiões Metropolitana (Cachoeirinha, Canoas Gravataí, Porto Alegre, Viamão) e Sudoeste (Bagé) do Estado do Rio Grande do Sul, com suspeita de leishmaniose. Estimasse realizar essa etapa logo no início do segundo semestre de 2017, após a resposta do CEUA e padronização dos métodos de coletas nos locais dispostos a cederem as amostras.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do primeiro ensaio laboratório foram satisfatórios, ocorrendo uma amplificação coerente das diluições para as amostras positivas e negativando o controle e a amostra de Cinomose. Se faz necessário aguardar a aprovação do CEUA para realizar as coletas de material biológico e ter início das análises epidemiológicas, mapeando os casos positivos e correlacionando-as com os ciclos do protozoário (urbano ou silvestre). A técnica de diagnóstico por PCR-Real time será utilizada para analisar novas amostras coletadas de cães da rotina do hospital veterinário da Universidade Luterana do Brasil, assim como amostras cedidas por clínicas, canis municipais e ONG's com suspeita de leishmaniose. Devido ao fato desta patologia ser recentemente relatada nos estados do Sul, um estudo que forneça informações sobre a real situação da população de canídeos domésticos e silvestres. Estes dados obtidos tornarão de mais fácil conhecimento a interferência do parasita no estado, sua origem, seu avanço, áreas de riscos e possíveis métodos de controle.

REFERÊNCIAS

- BASANO, S.A. e CAMARGO L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, nº 3, 2004
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.
- CARVALHO, A.A; MACÊDO, É.L.; VERÇOSA, B.L.A.; SILVA, S.M.M.; CARVALHO, S.M.; COSTA, F.A.L. Caracterização histológica e imunoistoquímica da nefropatia da leishmaniose visceral experimental em hamster. **Clínica Veterinária**, v.12, n.71, p.60-64, 2007.
- DE SOUZA, A. P. L.; DE JESUS, J. R.; TEIXEIRA M. C. Estudo retrospectivo da epidemiologia da leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul: revisão de literatura. **Veterinária em Foco**, v.11, n.2, jan./jun. 2014
- FOCACCIA R., FERREIRA M. S., SICILIANO R. F. VERONESI-FOCACCIA: **Tratado de Infectologia**. Editora Atheneu, 4. ed., 2 v., São Paulo, 2010.
- FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.137 p.214–221, 2006.
- IKEDA-GARCIA, F.A e MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, v. 12, n.71, p.34-42, 2007.
- KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; DA SILVA, A.A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.3, p.907-910, mai-jun, 2007
- LOSADA-BARRAGÁN, M.; CAVALCANTI, A.; et al. Detection and quantification of *Leishmania infantum* in naturally and experimentally infected animal samples. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 5-64, 2016
- MACHADO, J.G.; HOFFMAN, J.L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, v. 12, n.71, p.50-58, 2007.
- SECRETARIA DA SAÚDE-RS. Nota Técnica Conjunta Nº 01/2014 – CEVS – IPB-LACEN – SES/RS, Leishmaniose Visceral No Estado Do Rio Grande Do Sul, 2014