



ANÁLISE DE CARTÃO COMERCIAL PARA A DETECÇÃO DE DNA DE LEISHMANIA POR PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS CANINAS

Fernanda dos Santos Rolim¹
Gessilí Santana²
Maria Lucia Rossetti³

Resumo

As leishmanioses representam um grupo de doenças causadas por mais de 20 espécies de protista do gênero *Leishmania*. São transmitidas por meio da picada de insetos vetores (flebotomíneos). O aspecto clínico da leishmaniose no homem pode apresentar diferentes formas: cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral. 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. A detecção de *Leishmania* pode ser por métodos parasitológico, sorológico ou moleculares. Cartões comerciais para fixar amostras, tem sido relatado para o diagnóstico de várias doenças. O cartão com a amostra fixada, facilita o transporte e o armazenamento. O objetivo deste trabalho foi analisar a obtenção de DNA de *Leishmania* a partir de plasma fixado em cartão comercial para amplificação por PCR em tempo real. Quarenta amostras de plasma canino com diagnóstico de leishmaniose foram fixadas no cartão comercial protein saver 903. O DNA extraído do cartão foi analisado por PCR em tempo real. Das 20 amostras positivas, quatro delas não foram detectados DNA, e todas as 20 negativas, foram também negativas no PCR em tempo real. Este estudo demonstra a possível detecção de *Leishmania sp.* através do uso do cartão protein saver 903.

Palavras chave: Leishmaniose; Diagnostico; Protein saver 903

INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam um grupo de doenças causadas por mais de 20 espécies de protista do gênero *Leishmania*, ocorrendo em áreas tropicais e subtropicais. São transmitidas por meio da picada de insetos vetores, conhecidos como flebotomíneos, que infectam seus hospedeiros no repasto sanguíneo. As leishmanioses são reportadas nos 5

1 Aluno do curso de graduação farmácia – Bolsista FAPERGS – fernandarolim97@gmail.com

2 Mestre em biologia molecular – Bolsista PIBIC-EM/CNPq – gessilisantana@yahoo.com.br

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

continentes e consideradas endêmicas em 98 países (WHO, 2010). Em 2014, mais de 90% dos novos casos notificados à Organização Mundial da Saúde ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão.

Os hospedeiros do protista podem ser o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos (DESJEUX, 2004, WHO,2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Porém, o principal reservatório relatado na literatura ainda é o cão, podendo este ser infectado também por várias espécies de *Leishmania* (WHO, 2010).

O aspecto clínico da leishmaniose no homem pode apresentar diferentes formas: cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral. A leishmaniose visceral (LV) 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 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).

O diagnóstico de *Leishmania* pode ser proporcionado por diferentes métodos como parasitológico, sorológico ou moleculares (TAYLOR; COOP; WALL, 2010). A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método muito sensível e tem sido utilizado para diagnóstico das leishmanioses em estudos epidemiológicos e para detecção de parasitos em vetores e reservatórios (SILVA et al., 2004). A coleta de amostras fixadas em cartões comerciais tem sido relatada nos estudos de campo por facilitar o transporte e o armazenamento das amostras por um longo período. Além de ser compatível com o uso de diversas amostras biológicas como sangue, medula óssea, aspirado de linfonodo, raspagem de pele (GONZÁLEZ-MARCANO et al., 2016). Isso facilita pesquisas em áreas remotas com poucos recursos, onde o processamento de sangue e manutenção de amostras congeladas é mais difícil. A coleta em cartão comercial pode representar uma forma alternativa de baixo custo para solucionar estas dificuldades. Com isso, este trabalho teve como objetivo analisar a obtenção de DNA de *Leishmania* a partir de plasma fixado em cartão comercial através da técnica de PCR em tempo real.

METODOLOGIA

AMOSTRAS

Foram selecionadas 40 amostras sanguíneas de cães provenientes de um banco de amostras do laboratório de biologia molecular da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) sendo, 20 amostras positivas para leishmaniose e 20 negativas. As amostras foram testadas previamente através dos métodos sorológicos preconizados (Dual Path Platform e ELISA-EIE®) e por PCR em tempo real. Foram fixados 50 µL de plasma de cada amostra nos cartões (Whatman 903 Protein Saver Cards) e secados a temperatura ambiente por pelo menos quatro horas. Em seguida foram colocados em embalagem do tipo zip lock com dois dessecantes por cartão e congelados a -20°C. Para cada amostra fixada no cartão foram retirados dois discos de 3 mm de diâmetro com o auxílio do cortador Harris Uni-Core™ e transferidos para um microtubo eppendorf de 1,5 mL para a extração. Para cada extração foram retirados dois círculos sem amostras fixadas para o controle negativo.

EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído utilizando o mini-kit comercial QIAamp DNA (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA extraídas foram mantidas a -20 ° C até análise posterior.

PCR EM TEMPO REAL

Serão utilizados os primers 13A (5´-GTG GGG GAG GGG CGT TCT-3´) e 13B (5´-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3´) conforme descrito por Rodgers et al (1990). A amplificação tem como alvo uma região de 120 pares de bases dos minicírculos do gênero *Leishmania*. Essas sequências de DNA estão presentes em cópias múltiplas em uma região conservada dos minicírculos de DNA do cinetoplasto (kDNA). As condições para o PCR serão feitas conforme descrito por Rolim et al (2016).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 20 amostras positivas analisadas através do PCR em tempo real foi possível confirmar a presença de DNA de *Leishmania* em 16 amostras, sendo que em apenas 4 amostras não foi possível a detecção. Dentre as amostras negativas, nenhuma apresentou resultado positivo.

As amostras de sangue têm sido utilizadas para a análise do material genético, pois fornecem grandes quantidades de células que contém não só DNA, mas também uma variedade de agentes (HANSEN et al., 2007). Porém o volume de amostra contido no disco perfurado pode representar menos de 1% da amostra de sangue total capturada no cartão. Cox et al. (2010) afirma que o DNA fica onde é colocado no cartão e não se espalha uniformemente pela matriz. Além disso, os animais podem estar com baixa carga parasitaria. Sendo assim a probabilidade de perfurar discos com DNA, em uma amostra com baixa parasitemia, pode diminuir. No nosso trabalho, é possível que, estes fatos justifiquem as 4 amostras em que não foi possível a detecção de DNA de *Leishmania*.

Todavia, a detecção de DNA de *Leishmania* por meio de cartões comerciais tem demonstrado bons resultados para o diagnóstico em humanos. Estudos com amostras de sangue (OSMAN et al., 1997; CAMPINO et al., 2000; SILVA et al., 2004) e de medula óssea (ALAM et al., 2009) fixadas no cartão foram relatadas maior sensibilidade no diagnóstico de LV quando comparadas com métodos de cultura e exame direto. Semelhantes resultados também foram encontrados no diagnóstico da LC foram relatados por Fata et al. (2009) ao utilizar amostras de pele fixadas em cartão, porém era o cartão FTA.

CONCLUSÕES

Este estudo demonstra a possível detecção de DNA de *Leishmania sp.* A partir de amostras de plasma fixadas em cartão protein saver 903.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. Z.; SHAMSUZZAMAN, A. K. M.; KUHL, K.; SCHÖNIAN, G. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. **Tropical Medicine & International Health**., v. 14, p. 499-503, 2009.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J.; Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**., v.57, p. 1-88, 2004.
- 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.
- CAMPINO, L.; CORTES, S.; PIRES, R.; OSKAM, L.; ABRANCHES, P. Detection of *Leishmania* in immunocompromised patients using peripheral blood spots on filter paper and the polymerase chain reaction. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 19, p. 396-8, 2000.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immun Microbiol Infect Dis.**, v. 27, p. 305-18, 2004.

FATA, A.; KHAMESIPOUR, A.; MOHAJERY, M.; HOSSEININEJAD, Z.; AFZALAGHAEI, M.; BERENJI, F.; GANJBAKHSH, M.; AKHAVAN, A.A.; ESKANDARI, E.; AMIN-MOHAMMADI, A. Whatman paper (FTA cards) for storing and transferring Leishmania DNA for PCR examination. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 4, p. 37-42, 2009.

GONZÁLEZ-MARCANO, E.; KATO, H.; CONCEPCIÓN, J.L.; MÁRQUEZ, M.E.; MONDOLFI, A.P. Polymerase Chain Reaction Diagnosis of Leishmaniasis: A Species-Specific Approach. **Clinical Applications of PCR** - Chapter 11. v. 1392, p. 113-24, 2016.

HANSEN, T.V.O.; SIMONSEN, M.K.; NIELSEN, 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.

KIP, A.E.; ROSING, H.; HILLEBRAND, M.J.X.; BLESSON, S.; MENGESHA, B.; DIRO, E.; HAILU, A.; SCHELLENS, J.H.M.; BEIJNEN, J.H.; DORLO, T.P.C. Validation and clinical evaluation of a novel method to measure miltefosine in leishmaniasis patients using dried blood spot sample collection. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 60, p. 2081-9, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. v. 1(5), p. 120, 2014.

OSMAN, O.F.; OSKAM, L.; ZIJLSTRA, E.E.; KROON, N.C.; SCHOONE, G.J.; KHALIL, A.G.; EL-HASSAN, A.M.; KAGER, P.A. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2454-7, 1997.

ROELFSEMA, J.H.; NOZARI, N.N.; HERREMANS, T.; KORTBEEK, L.M.; PINELLI, E. Evaluation and improvement of two PCR targets in molecular typing of clinical samples of Leishmania patients. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 36-41, 2011.

ROLIM, F.; CARVALHO, F.L.N.; BELLO, G.L.; GEHLEN, M.; HALON, M.L.; LEMOS, R.R.; BARCELLOS, R.B.; ROSSETTI, M.L. Leishmaniose Visceral Canina: detecção de DNA em soro por PCR em tempo real. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, v. 14, p. 36-46, 2016.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; BRAZIL, R.P. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. **Genetics and molecular research**, v. 3, p. 251-7, 2004.

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

WHO. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**, Geneva, 22-26 March 2010. World Health Organization technical report series. N°949. p. 186.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em 27 de Maio. 2017.