

DETECÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC) PELA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR) EM CANÍDEOS DO RIO GRANDE DO SUL

Silveira VP^{1,2}, Salla PF³, Lehman FKM¹, Lunge VR^{1,4}, Ikuta N^{1,4}

¹ Laboratório de Diagnóstico Molecular da ULBRA ² Aluno de Medicina Veterinária da ULBRA –Bolsista CNPq

³ Aluna de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

⁴ Professor do curso de graduação Medicina Veterinária, e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

Introdução

A leishmaniose é uma patologia causada por protozoários do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae. Este parasito infecta as células do sistema fagocítico mononuclear dos vertebrados (entre os quais o homem e os cães) na sua forma aflagelada (amastigota), mas também possui uma forma flagelada (promastigota) encontrada no tubo digestivo de insetos vetores (*Lutzomyia* spp.). A infecção nos vertebrados ocorre durante o repasse sanguíneo realizado pelos insetos vetores portadores do parasito. A doença pode apresentar duas formas de manifestação: leishmaniose visceral (LV) que apresenta sinais sistêmicos com comprometimento de órgãos e risco de óbito, e a leishmaniose tegumentar americana (LTA) caracterizada apenas por lesões cutâneas. As espécies de *Leishmania* associadas a LV e LTA possuem um ciclo epidemiológico silvestre, onde marsupiais e canídeos silvestres são reservatórios do parasito, e um ciclo peridomiciliar, com os cães domésticos sendo afetados pela LV canina (LVC) e constituindo importantes reservatórios para a LV humana (LVH). A LVH ocorre em maior número nos estados no norte do Brasil, relacionada a populações de baixa renda e próxima a zonas rurais, tendo crianças como indivíduos mais suscetíveis. No Rio Grande do Sul, existem casos de LVH confirmados desde 2008, primeiramente em São Borja e depois em Porto Alegre. Recentemente, ocorreram novos casos no homem (três óbitos), principalmente em alguns bairros (Lajeado, Agronomia, Lomba do Pinheiro e Morro Santana) de Porto Alegre.

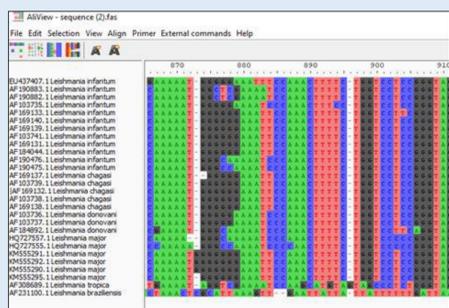
Objetivos

O presente estudo tem como objetivo estabelecer a detecção de LVC pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), em cães (sintomáticos e assintomáticos), canídeos silvestres e marsupiais.

Metodologia

Primeiramente, afim de localizar uma região genômica conservada do *Leishmania infantum*, foi selecionado *primers* específicos para a espécie, conforme previamente descrito (FRANCINO et al., 2006*). Após, o desempenho do teste (sensibilidade e especificidade) foi avaliado com o uso de controles positivos e negativos, além de amostras de sangue de cães. Apenas 19 amostras de cães com suspeitas de serem portadores da patologia foram analisados.

1. Analise *in silico*

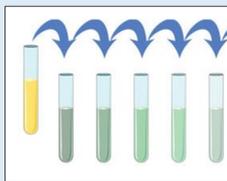


2. Otimização da Técnica qPCR

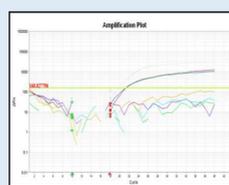
Extração DNA



Cascada de diluição



RT-PCR Real Time



Análise dos resultados (gráfico de amplificação)

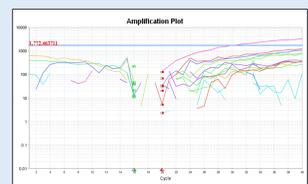
3. Amostras Veterinárias

19 cães com suspeita de LVC



RT-PCR Real Time

Análise dos resultados (gráfico de amplificação)



Detecção (gel de poliacrilamida)

Referências bibliográficas

- BASANO, S.A. e CAMARGO L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Rev. Bras. Epidemiol. Vol. 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.
- 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, ano 12, n.71, p.60-64, 2007.
- FOCACCIA R., FERREIRA M. S., SICILIANO R. F.VERONESI-FOCACCIA: Tratado de Infectologia. Editora Atheneu, 4. ed., 2 v., São Paulo, 2010.
- LOSADA-BARRAGÁN,M.;CAVALCANTI,A.; et al. Veterinary Parasitology Detection and quantification of *Leishmania infantum* in naturally and experimentally infected animal samples., v. 226, p. 5-64,2016
- 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. Vet. Parasitol. vol.137 p.214–221, 2006.

Resultados

Os resultados obtidos até agora demonstraram que a técnica apresenta uma performance analítica muito boa. Foram analisadas também 19 amostras, tendo como origem cães com suspeita clínica de LVC, nenhuma amostra apresentou resultado positivo.

Conclusões parciais

Novas amostras de cães domésticos e de animais selvagens estão sendo obtidas, buscando realizar um número maior de análises.