

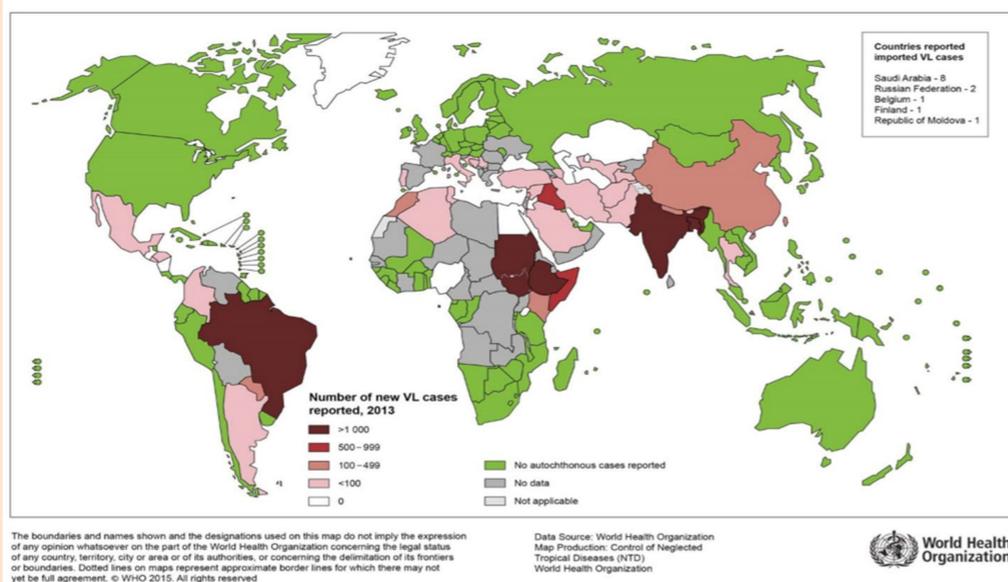
## ANÁLISE DE AMOSTRAS FIXADAS EM CARTÃO COMERCIAL PARA A DETECÇÃO DE DNA DE LEISHMANIOSE ATRAVÉS USO DO PCR EM TEMPO REAL

<sup>1</sup>Rolim, Fernanda., <sup>2</sup>Santana, Gessilí., <sup>2</sup>Rossetti, Maria Lucia  
<sup>1</sup>Curso de Farmácia, <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Biologia Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA, Canoas, RS.  
Contato: [mrossett@terra.com.br](mailto:mrossett@terra.com.br)

### INTRODUÇÃO

As leishmanioses estão entre as doenças mais negligenciadas do mundo. Estima-se que a cada ano ocorram 1,3 milhões de novos casos e mais de 20 000 mortes. Pertencem a um grupo de doenças causadas por mais de 18 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. O diagnóstico por métodos moleculares como PCR tem se mostrado bastante promissor. O PCR em tempo real tem sido muito utilizado. No entanto, poucos são os laboratórios que realizam esta metodologia, o que exige que as amostras coletadas em regiões distantes sejam transportadas para grande centros, dificultando o procedimento. Uma forma de facilitar esse processo seria coletar as amostras de sangue diretamente em cartão filtro, que por serem impregnados com componentes químicos podem reter a amostra facilitando o transporte. Além disso, possibilita a recuperação do DNA para a análise por PCR.

Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2013



### OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo avaliar a eficácia do método de extração de DNA de plasma a partir de cartão comercial para amplificação por PCR

### MÉTODOS

Extração de DNA das amostras de plasma canino, 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 positivas fixadas no cartão FTA *Classic*, e a extração de DNA das amostras de plasma foi realizada através do kit Whatman™ FTA™ Cards (Ge Healthcare Life Sciences).

Amplificação por PCR em tempo real teve como alvo uma região de 120 pb de minicírculos do gênero *Leishmania*. A amplificação por PCR em tempo real foi realizada em um termociclador StepOne Real Time PCR Systems e os produtos amplificados foram detectados por meio do marcador (fluoróforo) SYBR® Green.

### CONCLUSÃO

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.

### RESULTADOS

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. Sendo que das 50 negativas, 45 foram também negativas no PCR e 5 foram positivas. Por enquanto 6 amostras com resultados positivos foram armazenadas no cartão FTA para a análise por PCR em tempo real. Destas 6 amostras foram feitas as amplificações, por meio do termociclador StepOne Real Time, que por sua vez gerou uma curva de dissociação (Melting curve), onde se mostrou resultados inespecíficos, quando comparados ao controle positivo, necessitando de adequações na padronização do método.

### REFERÊNCIA

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Disponível em:

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

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.

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(3), p. 267-75, 1990.