

# PADRONIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE PCR PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Aline Leandra Carvalho Ferreira e Antero Silva Ribeiro de Andrade  
Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) no Brasil é causada pela espécie *Leishmania chagasi* (*L. infantum*) e os cães são considerados o principal reservatório doméstico desse parasita. Portanto, o diagnóstico correto e seguro é muito importante para evitar a transmissão da doença ou o sacrifício desnecessário de cães. Para investigação destes parasitas uma alternativa tem sido o uso das técnicas de PCR. As amostras clínicas mais comumente utilizadas para a detecção por PCR são os aspirados por punção de medula óssea, baço e linfonodos e as biópsias de pele (Queiroz, 2008). Entretanto, a maioria destas amostras é obtida de maneira invasiva, tornando muitas vezes inviável a realização do exame em cães devido à resistência dos proprietários. Uma alternativa interessante é a amostragem não invasiva através do swab conjuntival. Neste método um swab estéril é utilizado para realização de um esfregaço na conjuntiva ocular dos animais. Outro obstáculo para a implementação da técnica de PCR é a falta de padronização e segundo REITHINGER *et al* (2007) pouquíssimos trabalhos foram realizados até o momento com objetivo de comparar a eficiência das diversas técnicas de PCR disponíveis.

## OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi comparar amostras clínicas e métodos de PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

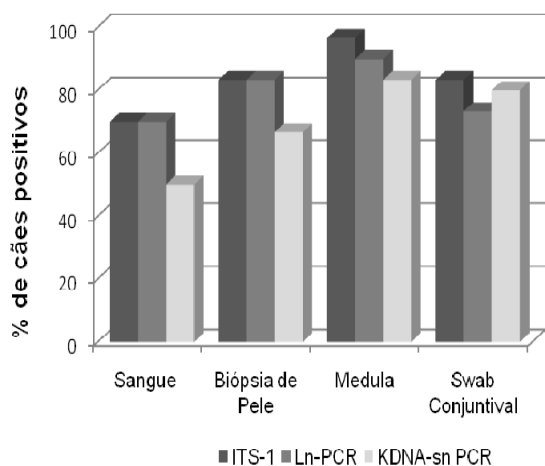
## METODOLOGIA

Foram utilizadas três técnicas de PCR: Internal Transcribed Spacer 1 Nested PCR (ITS-1 nPCR), *Leishmania Nested* PCR (LnPCR) e kDNA Semi-Nested PCR (kDNA snPCR) para avaliação de

amostras clínicas de sangue, pele, medula óssea e swab conjuntival de 30 cães sintomáticos, positivos nos testes sorológicos e exame parasitológico. Para a extração de DNA das amostras de sangue, pele e medula foram utilizados kits comerciais. A técnica de extração do DNA de swab conjuntival basou-se no trabalho de Ferreira *et al.* (2008). Os cães são originários da região metropolitana de Belo Horizonte. Seis cães saudáveis foram utilizados como controle negativo. Para a análise estatística foi utilizado o teste Qui quadrado ( $\chi^2$ ), com nível de significância de 5%.

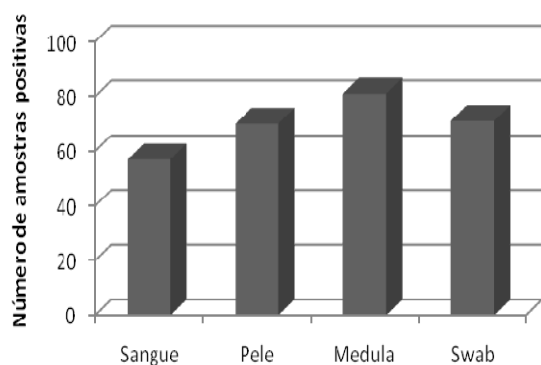
## RESULTADOS

Os resultados do método ITS-1 mostraram que não houve diferença estatística entre as positivities de amostras de pele, swab conjuntival e a medula. Apenas foi significativa a diferença entre as amostras de sangue e medula ( $p < 0,05$ ). O método Ln-PCR não apresentou qualquer diferença estatística entre as amostras. Observando os dados obtidos da técnica kDNA-sn PCR temos a medula e swab conjuntival com maiores positivities, sendo que o teste estatístico apontou diferença significativa entre as amostras de swab conjuntival e sangue e também entre a medula e sangue ( $p < 0,05$ ). As outras amostras quando comparadas entre si não mostraram diferença estatística. Considerando isoladamente cada amostra clínica não foi verificada diferença estatística entre a positividade dos 3 métodos de PCR testados (figura 1).



**Figura 1** - Porcentagem de cães positivos em cada amostra por técnica utilizada.

Comparando a positividade total das amostras clínicas (figura 2) verificou-se que a medula foi estatisticamente superior ao sangue, pele e swab conjuntival. Por sua vez não houve diferença estatística entre swab conjuntival e pele, sendo que estas duas amostras foram superiores ao sangue.



**Figura 2** - Total de amostras positivas entre os métodos investigados.

Ao confrontar as amostras positivas dos métodos ITS-1 e Ln-PCR não houve diferença estatística, o mesmo ocorreu entre o KDNA-sn PCR e Ln-PCR. Entretanto, foi observada uma diferença significativa entre a positividade dos métodos ITS-1 e KDNA-sn PCR ( $p < 0,05$ ).

## CONCLUSÕES

Analisando os métodos de PCR não houve diferença estatística dentro de cada amostra clínica. Em relação às amostras, o sangue mostrou o pior resultado, sendo estatisticamente inferior as demais amostras. A medula apresentou a maior positividade, seguida por swab conjuntival e pele que não obtiveram diferença estatística entre si, sendo ambas superiores ao sangue. Tendo em vista que as amostras de medula não são adequadas para os levantamentos epidemiológicos é recomendada a utilização do swab conjuntival que apresentou alta sensibilidade neste estudo e ainda é uma técnica não invasiva.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] World Health Organization. The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life. Geneva; 2002.
- [2] QUEIROZ, N. M. G. P. (2008), "Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e Elisa-teste". Tese de mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal. Brasil: Faculdade de Odontologia – UNESP, Campus de Araçatuba (SP).
- [3] REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. J. Clin. Microbiol., v. 45, n. 1, p. 21-25, 2007.

## APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

FAPEMIG e CNPq.