

RELAÇÃO ENTRE SOROPOSITIVIDADE E INFECTIVIDADE EM CÃES DE ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Cristiana de Melo Trinconi, Cárís Maroni Nunes, Juliano Rodrigues Sangalli, Henrique Borges de Paula, Valéria Marçal Félix de Lima, Márcia Dalastra Laurenti – Inter-áreas -Medicina Veterinária – Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal - Faculdade de Odontologia - Campus de Araçatuba.

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária de evolução crônica cuja transmissão envolve vetores da família dos flebotomíneos, sendo o cão doméstico o reservatório de maior importância para a transmissão ao homem. As principais medidas de controle da LV no Brasil estão baseadas no diagnóstico e tratamento de casos humanos, no controle dos vetores através do uso de inseticidas e na triagem sorológica com posterior eutanásia de cães positivos para leishmaniose. Além do aspecto de proteção animal, há controvérsias com relação à eficiência da eutanásia de cães como medida de controle da LV, principalmente pela dificuldade em se correlacionar soropositividade a infectividade em cães.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a relação entre soropositividade e infectividade através da amplificação de DNA de *Leishmania* sp. em cães de área endêmica para LV. Cães de um bairro de Araçatuba-SP que vinham sendo acompanhados quanto à susceptibilidade para LVC por um período de 2 anos e que foram encaminhados para eutanásia junto ao Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba-SP, após consentimento esclarecido de seus proprietários, foram utilizados para colheita de material biológico, para avaliação da presença de *Leishmania* sp. em diferentes tecidos. Os animais foram eutanasiados através da administração de Tiopental sódico 2,5%, seguido de Cloreto de potássio, pela via intravenosa. Inicialmente amostras de sangue e de pele de 39 cães de ambos os sexos e idade variada foram submetidas à análise. As amostras de pele foram coletadas na região do plano nasal dos cães, após uma prévia tricotomia no local, sendo conservadas a – 80°C.

Visando a obtenção do DNA da pele foi realizada a técnica de extração e purificação do DNA utilizando o kit QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante. Para a obtenção do DNA de leucócitos, as amostras de sangue foram submetidas ao protocolo de digestão com Proteinase K (20mg/mL), seguida da extração de DNA com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. Após a obtenção do DNA, as amostras foram quantificadas e avaliadas por espectrofotometria, com o auxílio do aparelho NanoDrop® (ND-100), para avaliação da concentração e qualidade do DNA.

A amplificação do DNA presente em minicírculos de kinetoplastos de *Leishmania* sp., foi realizada por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR), utilizado-se os oligonucleotídeos iniciadores 13A (5'-GTC GGG GAG GGG CGT TCT -3') e 13B (5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3') descritos por RODGERS et al. (1990), os quais amplificam fragmentos de 120 pb. Um controle positivo referente a DNA de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* mantidas em cultura e um controle negativo de cães sabidamente negativos para a presença de *Leishmania* sp. foram acrescentados na reação, além de um tubo apenas com água ultra-pura (SEM DNA).

Como controle da qualidade do DNA genômico de cão extraído, foi realizada a amplificação de fragmento de DNA de cão. Para tal, foram construídos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de fragmento de DNA de 202 pb da espécie canina, utilizando uma sequência correspondente a uma região de DNA repetitivo (BENTOLILA et al, 1999), depositada no banco de genes ("Gen Bank", número de acesso AJ239535). Para a construção destes oligonucleotídeos foi utilizado o programa "Primer3" disponível no endereço eletrônico http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_ww.cgi. Este controle tem importância em fornecer informações que evitam a publicação de resultados falso negativos quando realizado a técnica de amplificação de DNA de *Leishmania* sp. As amostras foram amplificadas em um aparelho termociclador (MJ Research Thermal cycler) com denaturação inicial a 95°C por 5 minutos, sendo

seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos para denaturação, 63°C por 45 segundos para anelamento, 72°C por 30 segundos para extensão e 72°C por 5 minutos para extensão final.

A técnica da eletroforese em gel de agarose 2% foi utilizada para a visualização dos produtos gerados pela PCR de DNA de cão. O gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, possui tamanho de “poros” que permite a separação perfeita de fragmentos que variam de 200 pb até 50 kb, sendo boa escolha para a visualização dos fragmentos de DNA de 202 pb. Marcadores moleculares em escada de 100 pb foram colocados em poços paralelos aos dos DNAs sob análise, servindo como referência. Após a corrida (100 volts, 40-50 min), os géis foram fotografados utilizando-se uma máquina fotográfica digital (Kodak digital science™ 1D) e luz ultra-violeta. A técnica da eletroforese em gel de poliacrilamida foi utilizada para a visualização dos produtos gerados pela PCR de DNA de *Leishmania* sp.. O gel de poliacrilamida possui poros reduzidos, sendo viável para separação de fragmentos de DNA menores sendo utilizados para a separação dos fragmentos de 120 pb de DNA de *Leishmania* spp.. Após a corrida (100 volts, três horas), os géis foram corados com solução de nitrato de prata.

As amostras de soro dos 39 cães foram avaliadas para a presença de anticorpos contra *Leishmania* sp. através da técnica de ELISA indireto (LIMA et al., 2001) revelando 69,2% de positividade.

A amplificação de kDNA de *Leishmania* sp. de amostras de sangue revelou 84,6% de positividade enquanto que nas amostras de pele a positividade foi maior (94,9%). A concordância observada entre os resultados da amplificação de DNA em amostras de sangue e em amostras de pele foi de 79,5%. A amplificação de fragmentos de *Leishmania* spp., a partir de amostras de pele realizada com os protocolos citados podem ser observados na Figura 1.

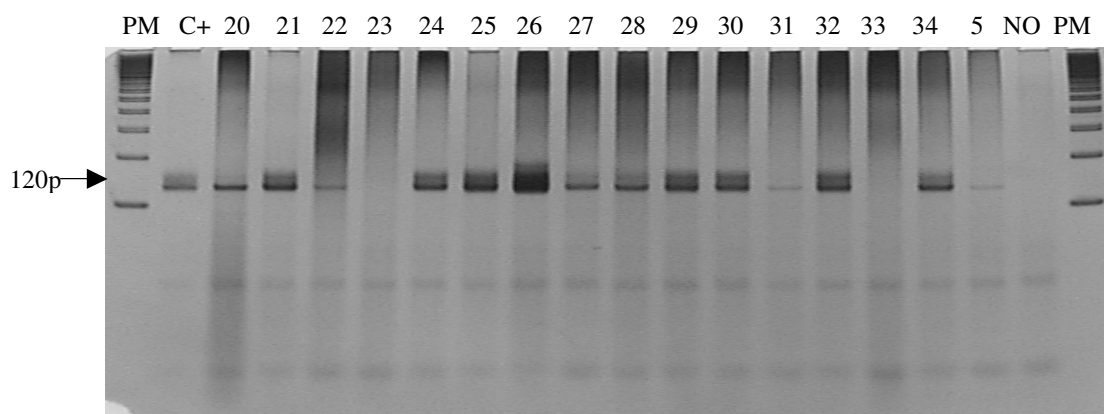


Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Produtos de amplificação de fragmentos de DNA de *Leishmania* sp. de 120 pb, através da técnica de PCR. PM = Peso Molecular em escada de 100 pb (Invitrogen®); C+ = DNA de pele de animal naturalmente infectado por *Leishmania* sp.; 20 – 34 e 5 = DNA de amostras de pele de cães; NO = sem DNA.

Adotando-se o método de ELISA como padrão e considerando-se a positividade por PCR das 39 amostras de sangue avaliadas, observa-se baixa sensibilidade (88,8%) e especificidade (25,0%) da PCR quando comparada com o teste de ELISA (Tabela 1), com concordância entre as duas técnicas de 69,2%. Por outro lado, considerando-se o resultado, por PCR, das amostras de pele avaliadas (Tabela 2), a sensibilidade foi mais alta (96,2%) embora a especificidade tenha sido muito baixa (2,6%), e a concordância tenha se mantido igual (69,2%).

Tabela 1. Amostras de sangue de cães segundo a técnica utilizada e o resultado observado para leishmaniose.

| PCR | ELISA | | TOTAL |
|-----------------|----------|----------|-------|
| | POSITIVO | NEGATIVO | |
| POSITIVO | 24 | 9 | 33 |
| NEGATIVO | 3 | 3 | 6 |
| TOTAL | 27 | 12 | 39 |

Tabela 2. Resultado do diagnóstico de leishmaniose em cães segundo a técnica utilizada.

| PCR da pele | ELISA | | Total |
|------------------|-----------|-----------|-------|
| | POSITIVOS | NEGATIVOS | |
| POSITIVOS | 26 | 11 | 37 |
| NEGATIVOS | 1 | 1 | 2 |
| TOTAL | 27 | 12 | 39 |

A sorologia identifica a presença de anticorpos evidenciando um contato prévio do hospedeiro com o parasita, porém não informa sobre a situação de infecção atual do animal, a qual pode ser mais bem avaliada com a técnica de PCR. Nas amostras de sangue, porém, esta técnica pode fornecer resultado falso negativo, uma vez que há probabilidade do parasita não estar em células da circulação sanguínea no momento da coleta. Embora de coleta mais invasiva, a avaliação de amostras de pele revelou maior sensibilidade e parece ser mais interessante quando se deseja determinar a presença do parasita e possibilidade de transmissão ao vetor, permitindo assim melhor caracterizar o potencial de reservatório do cão.

LIMA, V. M. F., CÂNDIDO, T C, MOREIRA, M A B, S JUNIOR, A F, BIDO, A V, R NETO, J L J, LUVIZZOTO, M C R. Evaluation of an Elisa assay for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis compared to indirect immunofluorescence assay and cytology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34 (Supl II), p.176, 2001.

Bentolila, S., Back, J.M., Kessler, J.L., Bordelais, A., Escoffier, K., Lamoroux, D., Dunan, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.55, p. 273-7, 1996.

Rodgers, M. R., S. J. Popper, and D. F. Wirth. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Exp. Parasitology**. v. 71, p. 267-275, 1990.