

RAFAEL ANTONIO DO NASCIMENTO RAMOS

Avaliação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da PCR em tempo real (qPCR) no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina utilizando diferentes amostras biológicas

RECIFE - PE

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Avaliação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da PCR em tempo real (qPCR) no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina utilizando diferentes amostras biológicas

RAFAEL ANTONIO DO NASCIMENTO RAMOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE - PE

2012

RAFAEL ANTONIO DO NASCIMENTO RAMOS

AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E DA PCR EM
TEMPO REAL (qPCR) NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA UTILIZANDO DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Dissertação de Mestrado

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Área de concentração: Biotecnologia

Aprovada em: 23/03/2012

Banca examinadora:

Dr. Leucio Câmara Alves
DMV/UFRPE/PE - Orientador

Dra. Gílcia Aparecida de Carvalho Silva
UAG/UFRPE/PE

Dra. Maria Aparecida da Gloria Faustino
DMV/UFRPE/PE

Dr. Marco Antonio Granja Barbosa
Médico Veterinário Autônomo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por permitir tantas conquistas em minha vida.

A meus pais Maria Isabel do Nascimento Ramos e Everaldo da Silva Ramos que abdicaram de muitas coisas na vida para me propiciar este momento.

Agradeço a meus irmãos Ingrid Carla do Nascimento Ramos e Carlos Alberto do Nascimento Ramos que sempre foram exemplos os quais eu procuro seguir tanto na vida profissional quanto pessoal.

À Thiara Ramona Cavalcante de Andrade por toda importância que representa em minha vida.

Ao Professor e amigo Leucio Câmara Alves por ter me guiado durante toda minha vida acadêmica e ter me ensinado a superar os obstáculos que a vida muitas vezes nos impõe.

À Professora Maria Aparecida da Gloria Faustino que muito me ensinou durante esses anos de convivência.

Às pessoas que fazem e fizeram parte do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos durante todo este período e que me propiciaram bons momentos: Andréa, Alessandra, Ana Maria, Antônio, Carlos, Danillo, Edna, Eduardo, Elizete, Fernanda, George, Gilsan, Guiomar, Hévila, Inês, João, Jonatas, Juliana, Júlio, Marcello, Márcia, Marco, Maria Luiza, Mariana França, Marilene, Marília, Nadine, Neurisvan, Pedro, Rebeka, Rita, Rodrigo, Sandra, Tadeu, Thyara, Vinícius, Vítor, Wagner e Whaubtyfran.

À equipe do Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP-Jaboticabal que contribuíram em parte para execução deste trabalho: Arvelino, Carla, Luis, Márcia, Márcia Jusi, Márcia Teixeira, Marcos, Meyre, Munhoz, Rafaela, Tatiana e a Professora Rosangela Zacarias Machado (UNESP-Jaboticabal).

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Área de Sanidade Animal do Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte (CNPGC –EMBRAPA) em especial ao Dr. Flabio Ribeiro de Araújo, Carlos Alberto e Elaine de Pádua.

À Dra. Maria Edileuza Felinto de Brito e a Dra. Milena de Paiva Cavalcanti do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CpqAM-FIOCRUZ) pela cessão de uma alíquota da cultura de *L. infantum* utilizada neste estudo.

À todos meus amigos da graduação e mestrado com quem convivi durante anos, onde passamos momentos felizes e tristes, aborrecimentos e boas conversas mas nunca deixamos de estar juntos. Todos vocês serão para sempre lembrados.

Aos amigos que fiz pelos corredores do Departamento de Medicina Veterinária, tanto alunos como os técnicos, espero levar boas recordações de todos vocês durante toda minha vida.

Aos professores que tenho como exemplos profissionais e a quem serei grato pela grande contribuição que deram a minha formação, em especial aos Professores Frederico Celso Lira Maia, Gílcia Aparecida de Carvalho Silva, Jean Carlos Ramos da Silva, Leonildo Bento Galiza e Rinaldo Aparecido Mota.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais esta conquista.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2	Página
Figura 1. Sinais clínicos observados nos animais naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> .	50
Figura 2. Número de parasitos/mL expressos em log 10 de acordo com o grupo clínico.	51
Capítulo 3	
Figura 1. Curva padrão construída a partir de diferentes diluições de DNA de <i>L. infantum</i> expressas em número de parasitos/mL.	60
Figura 2. Quantidade média de parasitas nos animais positivos na qPCR de acordo com o grupo clínico.	62

LISTA DE TABELAS

	Página
Capítulo 1	
Tabela 1. Resultados da PCR e qPCR em diferentes amostras biológicas de animais pertencentes a diferentes grupos clínicos.	38
Tabela 2. Resultados da PCR e qPCR em animais pertencentes a diferentes grupos clínicos.	38
Capítulo 2	
Tabela 1. Quantidade média de parasitos/mL em cães de diferentes grupos clínicos.	52
Capítulo 3	
Tabela 1. Ct médio, desvio padrão, média de parasito/mL e classificação clínica dos animais positivos.	61

RESUMO

Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma importante zoonose parasitária endêmica no Brasil, causada pelo protozoário denominado *Leishmania infantum*. Em áreas urbanas, os cães são considerados os principais reservatórios deste parasito. Sendo assim, a importância destes animais no ambiente urbano tem estimulado a realização de numerosos estudos para avaliação de técnicas de diagnóstico. Entre os estudos, vários têm proposto ferramentas moleculares (ex. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR)) como importantes métodos para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães. No entanto, pouco se sabe sobre qual amostra biológica é mais viável, considerando que várias podem ser utilizadas (ex. medula óssea, linfonodo, baço, pele). Assim, os objetivos deste estudo foram: i) determinar o desempenho da PCR e qPCR no diagnóstico da LVC utilizando diferentes amostras biológicas; ii) quantificar a carga parasitária na medula óssea, linfonodo, baço e pele de cães relacionando-a com os sinais clínicos apresentados pelos animais. Para tanto, foram utilizados cães naturalmente infectados por *L. infantum* provenientes de uma área endêmica. Amostras de medula óssea, linfonodo, baço e pele foram coletadas para avaliação da PCR e qPCR, e quantificação da carga parasitária. No presente estudo, qPCR foi capaz de detectar um grande número de animais positivos em comparação da PCR. Não se observou diferença significativa entre as amostras biológicas na comparação da PCR e qPCR. Considerando a carga parasitária em diferentes amostras biológicas, não foi observada diferença significativa, por outro lado, de acordo com os diferentes grupos clínicos foi detectada diferença significativa. Os achados do presente estudo sugerem que a carga parasitária na medula óssea, linfonodo, baço e pele é maior nos animais que apresentam um maior número de sinais clínicos (carga parasitária nos animais polissintomáticos > carga parasitária nos animais oligossintomáticos > carga parasitária nos animais assintomáticos). Além disso, considerando a facilidade de obtenção, sugere-se o linfonodo como a amostra mais viável para a detecção molecular de *L. infantum* em cães.

Palavras-chave: *Leishmania*, diagnóstico, molecular

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is an important parasitic zoonosis endemic in Brazil, caused by the protozoa known as *Leishmania infantum*. In the urban area, the dogs are considered the main reservoir of this parasite. Thus, the importance of dogs in the urban environment has stimulated numerous studies for the assessment of diagnostic techniques. Among these studies, several have proposed the molecular tools (e.g. Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real time PCR (qPCR)) as important methods for diagnosis of infection by *L. infantum* in dogs. However, little is known about the better biological samples used in these techniques, considering that several samples may be utilized (e.g. bone marrow, lymph node, spleen, skin). Hence, the aims of this study were i) to determine the performance of polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR (qPCR) in the diagnosis of CVL using different biological samples; ii) to quantify the parasite load in the skin, bone marrow, lymph node and spleen of dogs and relate the findings to clinical status. For such, infected dogs by *L. infantum* from an endemic area were utilized. Samples of bone marrow, lymph node, spleen and skin were collected by assessment of PCR and qPCR, and quantification of parasite load. In the present study, qPCR was able to detect a greater number of positive animals in comparison to PCR. No significant differences between biological samples were found in the detection of *L. infantum* DNA using PCR or qPCR. Considering the parasite load on different biological sample, it was not observed significant difference, on the other hand, among the clinical group was detected significant difference. The findings of the present study suggests that the parasite load on bone marrow, lymph node, spleen and skin is greater among those dogs with more clinical signs (parasite load on polysymptomatic animals > parasite load on oligosymptomatic animals > parasite load on asymptomatic animals). In addition, considering the easy of acquiring lymph node samples further demonstrates the greater viability of this biological material in the routine diagnosis of infection by *L. infantum* in dogs.

Key-words: *Leishmania*, diagnosis, molecular

SUMÁRIO

1.	Introdução	13
2.	Revisão bibliográfica	15
2.1	Agente etiológico	15
2.2.	Epidemiologia	15
2.3.	Distribuição geográfica	16
2.4.	Patogenia e sinais clínicos	18
2.5.	Diagnóstico	18
2.5.1.	Parasitológico	19
2.5.2.	Sorológico	19
2.5.3.	Molecular	20
3.	Referências	23
4.	Objetivos	31
4.1.	Geral	31
4.2.	Específicos	31
	CAPÍTULO 1	32
	Resumo	33
	Abstract	33
1.	Introdução	34
2.	Material e métodos	35
2.1	Aspecto ético	35
2.2.	Local e Animais	35
2.3.	Amostras biológicas	36
2.4.	Diagnóstico molecular	36
2.4.1.	Extração de DNA	36
2.4.2.	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	36
2.4.3.	PCR em tempo real	36
2.5.	Análise dos dados	37
3.	Resultados	37
3.1.	Avaliação clínica	37
3.2.	PCR e qPCR	37
4.	Discussão	39
5.	Conclusões	41

6.	Referências	41
	CAPÍTULO 2	45
	Resumo	46
	Abstract	46
1.	Introdução	47
2.	Material e métodos	48
2.1.	Aspecto ético	48
2.2.	Local e animais	48
2.3.	Amostras biológicas	49
2.4.	Diagnóstico molecular	49
2.4.1.	Extração de DNA	49
2.4.2.	PCR em tempo real	49
2.4.3.	Análise dos dados	50
3.	Resultados	50
3.1.	Avaliação clínica	50
3.2.	PCR em tempo real	51
4.	Discussão	52
5.	Conclusão	53
6.	Referências	53
	CAPÍTULO 3	55
	Resumo	56
	Abstract	56
1.	Introdução	57
2.	Material e métodos	57
2.1.	Aspecto ético	57
2.2.	Local e animais	58
2.3.	Amostras biológicas	58
2.4.	Diagnóstico molecular	58
2.4.1.	Extração de DNA	58
2.4.2.	PCR em tempo real	59
2.4.3.	Análise dos dados	59
3.	Resultados	60
4.	Discussão	62

5.	Conclusões	63
6.	Referências	63
7.	Considerações finais	65
8.	Anexo	66