

AVALIAÇÃO DO SWAB CONJUNTIVAL EM INQUÉRITO CANINO E COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE PCR PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Antero Silva Ribeiro de Andrade¹

O controle da leishmaniose visceral (LV) no Brasil envolve a eliminação de cães infectados, principais reservatórios da enfermidade. Métodos diagnósticos confiáveis são essenciais para evitar a transmissão da doença ou a eutanásia desnecessária de animais. O programa de controle da LV é baseado em inquéritos sorológicos, tendo sido utilizados a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Tais técnicas, entretanto, têm apresentado problemas quanto à especificidade e à sensibilidade, de forma que ainda hoje permanece o desafio para obtenção de um método de diagnóstico apropriado. A técnica da *Polimerase Chain Reaction* (PCR) vem sendo apontada como ferramenta valiosa para a identificação de *Leishmania*, capaz de detectar a infecção antes da soroconversão e em cães assintomáticos. A técnica é suficientemente sensível, específica e rápida para atender às necessidades dos programas de controle. A utilização de metodologias não invasivas de coleta de amostras, porém, é essencial para a viabilização da técnica em levantamentos rotineiros, pois diminuem a resistência dos proprietários dos cães em aceitar os exames e permitem que o procedimento possa ser realizado fora de clínicas veterinárias. Em uma etapa anterior, padronizamos o método do *swab*

conjuntival (SC) para a coleta de amostras para a reação de PCR e um procedimento de extração de DNA. Neste método um *swab* estéril, é utilizado para realização de um esfregaço na conjuntiva ocular dos animais. O procedimento é simples, rápido, não invasivo e apresentou alta sensibilidade. No presente trabalho, estudos foram conduzidos, buscando avaliar SC para o diagnóstico rotineiro da leishmaniose visceral canina (LVC).

A sensibilidade do SC foi avaliada em 80 cães, divididos em dois grupos de 40 cada um, de acordo com a ausência (grupo 1) ou a presença (grupo 2) de sinais clínicos compatíveis à LVC. As amostras clínicas foram analisadas por kDNA PCR-hibridização e PCR em tempo real (qPCR). As positivities obtidas pelo kDNA PCR-hibridização para os grupos 1 e 2, respectivamente, foram: conjuntiva direita, 77,5% e 95,0%; conjuntiva esquerda, 75,0% e 87,5%; pele, 45,0% e 75,0%; medula óssea, 50,0% e 77,5%; e sangue, 27,5% e 22,5%. As positivities para o SC foram equivalentes ($p>0,05$) ou superiores àquelas referentes às amostras de coleta invasiva ($p<0,05$). Os dados de qPCR revelaram que as cargas parasitárias cutâneas dos dois grupos de cães foram equivalentes entre si ($p>0,05$) e mais altas em relação às demais amostras dentro de cada grupo ($p<0,05$).

¹ Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN)
antero@cdtn.br

O método do SC foi também utilizado, juntamente com a sorologia, para um levantamento em 42 cães vacinados contra a leishmaniose da Polícia Militar (PM-MG). Os ensaios sorológicos foram realizados independentemente por três laboratórios. Os laboratórios A e B foram privados. O laboratório C foi o Laboratório de Referência Nacional. A triagem sorológica realizada pelo laboratório A apresentou 15 cães reativos. O laboratório B confirmou apenas 3 cães reativos, e o laboratório C confirmou 7 cães reativos. A PCR utilizando o SC foi capaz de detectar DNA de *Leishmania* em 17 animais e confirmou todos os casos simultaneamente reativos nos testes sorológicos de dois dos laboratórios.

Um estudo comparativo entre cinco técnicas moleculares foi conduzido em 30 cães assintomáticos com exames parasitológico e sorológico positivos. Amostras clínicas de medula óssea (M), sangue periférico (S), *swab* conjuntival (SC) e biópsias de pele (BP) foram analisadas pelos métodos kDNA PCR – hibridização, kDNA semi *nested* PCR (kDNA snPCR), *Leishmania nested* PCR (LnPCR), *Internal Transcribed Spacer 1 nested* PCR (ITS-1 nPCR) e PCR em tempo real (qPCR). As análises pelo método kDNA PCR-hibridização detectaram 36,6% cães positivos para as amostras de S, 57% para BP, 83,3% para M e 80% para SC. Pelo kDNA snPCR, foram encontrados 23,3% de cães positivos para B, 57% para BP, 40% para as amostras de M, e 80% para amostras de SC. Através do LnPCR, foram detectados 30%

cães positivos para as amostras de sangue S, 43,3% para BP, 50% para M, e 63,3% para SC. As análises por ITS-1 nPCR das amostras de B detectaram 63,3% cães positivos, 63,33% para BP, 97% para M, e 93,3% para SC. A qPCR apresentou os melhores resultados para todas as amostras: 90% para B, 93,3% para BP, 100% para M, e 96,7% para SC, e não foi verificada diferença estatística entre a positividade das amostras. O SC, devido ao procedimento não invasivo, associado à qPCR foi considerada como a combinação mais indicada para o diagnóstico da LVC.

Tendo em vista os resultados anteriores, um estudo de campo em área endêmica foi conduzido em paralelo ao inquérito censitário canino realizado pela Coordenação de Zoonoses de Belo Horizonte. A prevalência da LVC foi investigada através do SC associado à qPCR, e os resultados, comparados aos obtidos pela sorologia. Um total de 1.081 cães domiciliados foi utilizado. Destes 11% (119/1081) foram positivos no ELISA, 5% (54/1081) foram positivos no ELISA e no IFAT, e 25% (270/1081) foram positivos pela qPCR. O diagnóstico molecular utilizando o SC apresentou sensibilidade muito superior à sorologia, indicando que a prevalência da LVC tem sido subestimada nos inquéritos sorológicos.

Concluimos que o SC propicia diagnósticos sensíveis e específicos que possibilitariam remover de forma precoce cães infectados do ambiente e deveria ser considerado para os inquéritos caninos nos programas de controle da LV. ■