

## Roteiro Prático

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários parasitas do gênero *Leishmania* que afetam cães e podem ser transmitidos aos seres humanos (Yasur-Landau *et al.*, 2017). O ciclo de vida desses parasitas inicia-se no momento que um indivíduo infectado é picado por vetores flebotomíneos. No flebotomíneo, o parasita sofre alterações, assumindo uma forma potencialmente infectante. Uma vez infectado, o mosquito pode transmitir o parasita através da picada, de modo que o protozoário é liberado no sangue do mamífero através do repasto sanguíneo (Sunter & Gull, 2017). Existem dois tipos principais de leishmaniose: a cutânea e a visceral, que se diferenciam pela espécie de parasita, bem como pelo quadro clínico apresentado pelos animais. A forma cutânea é causada por *L. major* e *L. mexicana* enquanto que a forma visceral por *L. donovani* e *L. chagasi*.

Nos últimos três anos, a cidade de Florianópolis registrou alguns casos de leishmaniose visceral em humanos. Segundo o Jornal Hora de Santa Catarina (15 de setembro de 2017): “Homem de 34 anos recebeu tratamento no Hospital Nereu Ramos e obteve alta na última quarta-feira (13/09/2017). Segundo o levantamento da Secretaria de Saúde de Florianópolis, a leishmaniose visceral canina, que antes se concentrava na região da Lagoa da Conceição, agora está distribuída em 34 bairros da capital. Desde 2010, o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) investigou mais de 7.000 cães, em especial nas regiões onde já foi confirmada a presença de animais infectados. Em 2017, foram testados 713 cães e detectados 62 casos da doença, segundo último levantamento divulgado pelo CCZ. A maioria localizada na Lagoa da Conceição, no Canto da Lagoa e na Costa da Lagoa, mas bairros como Rio Tavares, Pantanal, Córrego Grande e Itacorubi também estão na lista”.

Atualmente, o diagnóstico realizado no CCZ é por meio de ensaios imunológicos (imunofluorescência indireta e ELISA), seguindo as recomendações do Manual de Vigilância do Ministério da Saúde. Porém, a fim de confirmar os resultados obtidos, amostras de sangue de 3 (três) animais foram enviadas ao seu laboratório para extração de ácidos nucleicos e realização dos seguintes testes:

1. PCR para o diagnóstico molecular de parasitas do gênero *Leishmania*.
2. PCR para distinção da espécie de *Leishmania*: *L. major* × *L. chagasi*.
3. RT-PCR para a análise da expressão do gene *ACTB* ( $\beta$ -actina).
4. RT-PCR para análise da expressão do gene *NOS* (óxido nítrico sintase).
5. PCR para identificação de um alelo específico do gene *DEF* (defensina) potencialmente envolvido na resistência à leishmaniose.

PCR # \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Reagentes PCR convencional			Volume ( $\mu\text{L}$ )	
Reagente	[ ] inicial	[ ] final	1 reação	5 reações
Tampão	10 ×	1 ×		
dNTP Mix	10 mM	0,4 mM		
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2 mM		
Iniciador Senso	10 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$		
Iniciador Antissenso	10 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$		
Taq DNA Polymerase	5 U/ $\mu\text{L}$	1 U		
Água	qsp 20 $\mu\text{L}$			
Amostra	5 $\mu\text{L}$			
Volume final por reação = 25 $\mu\text{L}$				

## Referências

- Sunter J, Gull K (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol*, 7: 1–13.
- Yasur-Landau D, Jaffe CL, Doron-Faigenboim A, David L, Baneth G (2017). Induction of allopurinol resistance in *Leishmania infantum* isolated from dogs. *PLoS Negl Trop Dis*, 11: e0005910.