

VIII SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

XVI SEMANA DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

I ENCONTRO DE SAÚDE ÚNICA EM PARASITOLOGIA

Setembro de 2017, Unesp Araçatuba/SP, Brasil

01. DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *LEISHMANIA*: RESULTADOS PRELIMINARES

Molecular differentiation of *Leishmania* species: preliminary results

TRIGO, B. B.;¹ PAULAN, S. C.;² OLIVEIRA, F. M.;² KUBOTA, D. K. K.;³ ITO, P. K. R. K.;⁴ NUNES, C. M.⁵

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araçatuba/SP, Brasil. E-mail: beatrizbtrigo@hotmail.com

² Doutora em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (Unesp), Araçatuba/SP, Brasil.

³ Bolsista do Programa de Iniciação Científica (CNPq/Pibic Jr.), Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Faculdade de Medicina Veterinária (Unesp), Araçatuba/SP, Brasil.

⁴ Médico-veterinário formado pela Faculdade de Medicina Veterinária (Unesp), Araçatuba/SP, Brasil.

⁵ Professora adjunta do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (Unesp), Araçatuba/SP, Brasil.

Mais de vinte espécies de *Leishmania* causam amplo espectro de manifestações clínicas em animais e humanos, sendo genericamente classificadas em leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV), todas com ocorrência no Brasil. O diagnóstico dessa zoonose é estabelecido por avaliação clínica, sorológica e parasitológica (visualização de formas amastigotas), seguida ou não do isolamento em meio de cultura e, mais recentemente, por técnicas moleculares. Atualmente o “padrão ouro” para diferenciação das espécies de *Leishmania* spp. é a eletroforese de isoenzimas (*multilocus enzyme electrophoresis* – MLEE), técnica laboriosa, de aplicação restrita a amostras cultivadas e realizada em laboratórios de referência. Entretanto, como as técnicas baseadas na reação em cadeia pela polimerase (PCR) têm sido amplamente aplicadas para a caracterização e

diferenciação das espécies de *Leishmania*, elas passaram a ser um importante recurso para estudos epidemiológicos e para a priorização de medidas de controle dessa zoonose. Este trabalho propõe a validação, por PCR em Tempo Real (qPCR), de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) previamente validados *in silico* por PCR eletrônico. Adicionalmente, alguns dos *primers* já validados e descritos como espécie-específicos também foram incluídos nesta validação por qPCR. Os *primers* foram testados em estirpes de referência de *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. major*, cedidas pela coleção de *Leishmania*, do Instituto Oswaldo Cruz, e de *L. chagasi*, estirpe isolada localmente e cedida pelo Laboratório de Imunologia da FMVA da Unesp. De 186 pares de *primers* validados *in silico*, foram inicialmente escolhidos e testados cinco pares para cada espécie: um para *L. amazonensis*; um para *L. infantum*; dois para *L. braziliensis*; e dois para *L. major*. Os resultados obtidos confirmam a especificidade do par de *primers* para *L. amazonensis*. Os demais pares não apresentaram resultados satisfatórios, tanto relacionados à não amplificação de fragmento de DNA, como à inespecificidade. Tais fatos podem estar relacionados a fatores como: variação entre as estirpes, formação de dímeros, presença de regiões repetitivas do genoma, dentre outros, uma vez que a análise *in silico* realizou seleção randômica e ampla para potenciais *primers* num conjunto de dados específico. Outros *primers* deverão ser testados até que se obtenha um conjunto de pares espécie-específicos adequado para a composição de uma plataforma que permita estabelecer o diagnóstico diferencial das leishmanioses.

02. VALIDAÇÃO LABORATORIAL DA TÉCNICA DE TF-TEST QUANTIFIED PARA O DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMÍASE MANSÔNICA

Laboratory validation of the TF-Test Quantified technique for schistosomiasis mansoni diagnosis

SANTOS, B. M.;¹ SOARES, F. A.;² ROSA, S. L.;³ SUZUKI, C. T. N.;⁴ BRESCIANI, K. D. S.;⁵ FALCÃO, A. X.;⁶ GOMES, J. E.⁷

¹ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Ciências Médicas e pesquisadora do Laboratory of Image Data Science (LIDS), Instituto de Computação (Unicamp), Campinas/SP, Brasil. E-mail: biancamsantos@yahoo.com.br

²Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas e pesquisador do Laboratory of Image Data Science, Instituto de Computação (Unicamp), Campinas/SP, Brasil.

A esquistossomiase mansônica, altamente prevalente no mundo, é responsável por um elevado número de óbitos em seres humanos. O diagnóstico dessa moléstia é estabelecido com o emprego de técnicas laboratoriais convencionais quantitativas, com destaque para o exame parasitológico das fezes. Entretanto, pesquisadores têm observado que os exames parasitológicos quantitativos podem apresentar baixas e moderadas sensibilidades diagnósticas, o que justifica a busca de técnicas mais sensíveis e eficientes que possam ser utilizadas em programas de controle governamentais. Este trabalho foi delineado para a validação da técnica parasitológica TF-Test Quantified para detecção quantitativa de ovos de *Schistosoma mansoni* em fezes de camundongos (*Mus musculus*) experimentalmente infectados. Foram realizados quatro experimentos com um total de 43 animais infectados por cercárias da estirpe BH (originária de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais) de *S. mansoni*. Os três primeiros experimentos permitiram desenvolver e avaliar um protocolo operacional para a técnica quantitativa de TF-Test Quantified. Para isto, as fezes eliminadas pelos animais no período de 24 horas, entre o 45º e o 69º dia após a infecção experimental, foram colhidas, pesadas e processadas em laboratório pela técnica de TF-Test Quantified. A partir do 70º dia de infecção os animais foram eutanasiados para recuperação dos vermes adultos no sistema porta-hepático e posterior obtenção de uma estimativa de eliminação diária de ovos por fêmea de *S. mansoni*. Esse procedimento possibilitou definir um novo fator de conversão para a quantificação de ovos por grama (OPG) nas fezes desses animais. A partir desses resultados foi realizado um quarto experimento de validação laboratorial da nova técnica parasitológica de TF-Test Quantified, em comparação com a técnica de Helm-Teste e Exame Padrão Verdadeiro (Gold Standard). Os resultados preliminares já obtidos entre as duas técnicas parasitológicas e confirmados com o Gold Standard, foram favoráveis à técnica de TF-Test Quantified, a qual apresentou 100% em termos de parâmetros diagnósticos de sensibilidade, 100% de positividade e concordância *Kappa* (*k*) e sua classificação como “Quase Perfeita”. Os resultados preliminares já obtidos indicam que o ganho de sensibilidade diagnóstica de forma quantitativa que essa nova técnica deverá proporcionar, importante contribuição para a realização de inquéritos populacionais e monitoramento de programas de controle da parasitose.

Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Esquistossomose mansônica. In: **Doenças infecciosas e parasitárias**: guia de bolso. 8. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. p. 171-175.

CARVALHO, G. L. X. et al. A comparative study of the TF-Test®, Kato-Katz, Hoffman-Pons-Janer, Willis and Baermann-Moraes coprologic methods for the detection of human parasitosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 1, p. 80-84, 2012.

COLLEY, D. G. et al. Human Schistosomiasis. **Lancet**, London, v. 383, n. 9936, p. 2253-2264, 2014.

HAILU, T.; ABERA, B. Performance evaluation of direct saline stool microscopy, formol-ether concentration and Kato-Katz diagnostic methods for intestinal parasitosis in the absence of gold standard methods. **Tropical Doctor**, London, v. 45, n. 3, p. 178-182. 2015.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos Ocidentais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis: countries x indicators**. 2010. Disponível em: <<https://goo.gl/2PiaCw>>. Acesso em: 8 nov. 2018.

_____. **Integrating neglected tropical diseases into global health and development**: fourth WHO report on neglected tropical diseases. 2017. Disponível em: <<https://goo.gl/vNcmjV>>. Acesso em: 8 nov. 2018.

03. CRYPTOSPORIDIUM PARVUM GENOTIPADO DE AMOSTRAS FECAIS DE POMBOS-CORREIO COLUMBA LIVIA DE COMPETIÇÃO

Cryptosporidium parvum genotyped from fecal samples of competition carrier pigeons, *Columba livia*

OLIVEIRA, B. C. M.;¹ FERRARI, E. D.;² PANEGOSSO, M. F. C.;² NAKAMURA, A. A.;³ NAGATA, W. B.;² MEIRELES, M. V.;⁴ BRESCIANI, K. D. S.⁵

¹ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araçatuba/SP, Brasil. E-mail: elisd.ferrari@yahoo.com.br