

## SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E HUMANA POR PCR EM TEMPO REAL E COMPARAÇÃO COM TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO

**Bruna Kelly Costa Amaral**

Iniciação Científica - Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)  
[bruna.amaral@aluno.unifametro.edu.br](mailto:bruna.amaral@aluno.unifametro.edu.br)

**Ludimila Garrido Moura**

Iniciação Científica - Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)  
[ludimilagarridomoura@aluno.unifametro.edu.br](mailto:ludimilagarridomoura@aluno.unifametro.edu.br)

**Gabriela Pereira**

Estágio Curricular Supervisionado I - Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)  
[gabriela.pereira01@aluno.unifametro.edu.br](mailto:gabriela.pereira01@aluno.unifametro.edu.br)

**Cassio Marinho Campelo**

Universidade Federal do Ceará (UFC)  
[kciocampello@gmail.com](mailto:kciocampello@gmail.com)

**Claudia Maria Leal Bevilaqua**

Pesquisadora - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UECE  
[claudia.bevilaqua@uece.br](mailto:claudia.bevilaqua@uece.br)

**Luciana Magalhães Melo**

Professora orientadora - Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)  
[luciana.melo@professor.unifametro.edu.br](mailto:luciana.melo@professor.unifametro.edu.br)

**Área Temática:** Clínica e biotecnologias aplicadas em medicina veterinária

**Área de Conhecimento:** Ciências da Saúde

**Encontro Científico:** X Encontro de Iniciação à Pesquisa

### RESUMO

**Introdução:** Leishmaniose visceral (LV) acomete cães e humanos e é causada pelo protozoário da espécie *Leishmania infantum*. Na rotina clínica, o teste sorológico imunocromatográfico é muito utilizado. PCR em tempo real (qPCR) e ELISA são indicados para diagnóstico definitivo.

**Objetivo:** Comparar uma estratégia de qPCR com teste imunocromatográfico no diagnóstico da LV em pacientes caninos e humanos, bem como apresentar as sensibilidades obtidas por curva-padrão em cada espécie. **Métodos:** Amostras de DNA foram obtidas de cães (n=6) e humanos (n=17) previamente triados como positivos para calazar por teste imunocromatográfico tipo DPP.

As cargas parasitárias dos pacientes e a sensibilidade *in vitro* em cada espécie foram acessadas através de curvas padrão para kDNA. A acurácia da quantificação de uma amostra de DNA padrão contendo 500.000 leishmanias/ $\mu$ L foi também realizada. **Resultados:** O qPCR permitiu a detecção 0,025 e 0,05 leishmanias/ $\mu$ L de sangue canino e humano, respectivamente. Apenas 16,7%(1/6) dos pacientes caninos apresentou qPCR positivo, com parasitemia  $9,75\pm 0,11$  leishmanias/ $\mu$ L de sangue (média $\pm$ d.p.). Dentre os pacientes humanos, 95,1%(16/17) apresentaram qPCR positivo, com valores de carga parasitária variando de  $0,39\pm 0,28$  a  $8.640,08\pm 226,99$  leishmanias/ $\mu$ L (média $\pm$ d.p.). **Conclusão:** A presente pesquisa registra o desenvolvimento de uma estratégia de qPCR com elevada sensibilidade para o diagnóstico molecular da LV canina e humana. Essa condição é especialmente relevante, pois, muitas vezes, o acesso à carga parasitária por qPCR, para acompanhamento de progressão da patologia, se faz necessária. Este estudo evidencia a necessidade de investigação adicional da sensibilidade e da especificidade dos métodos diagnósticos de calazar canino, especialmente em pacientes assintomáticos. **Palavras-chave:** Leishmania; Calazar; Homem; Cão; kDNA

**Financiamento:** O presente trabalho foi realizado com apoio do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica na Amazônia (PROCAD/Amazônia) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## INTRODUÇÃO

As Leishmaníases têm como agentes causadores, protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e Gênero *Leishmania*. A classificação taxonômica mais atual divide o gênero *Leishmania* em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Estes diferentes complexos albergam as espécies de agentes etiológicos envolvidos no acometimento das leishmaníases tegumentar (LT) e visceral (LV) (OMS, 2016).

Na LV, a principal espécie envolvida na América do Sul é *Leishmania infantum* (DANTAS-TORRES, 2006), sendo caracterizada por lesões que afetam os órgãos internos, levando frequentemente a óbito na ausência de tratamento. Acomete principalmente pacientes imunodeprimidos, crianças e idosos. A forma visceral é demonstrada pelo intenso dano em órgãos vitais e anemia grave, sendo uma síndrome clínica, caracterizada por febre irregular de longa duração, desnutrição, hepatoesplenomegalia, leucopenia e trombocitopenia (BRASIL, 2006).

O diagnóstico das leishmaníases é realizado principalmente a partir do exame clínico e de técnicas laboratoriais, que se constituem por métodos: parasitológico, imunológico e molecular (ALVES E BEVILACQUA, 2004). Atualmente, as técnicas diagnósticas moleculares vêm sendo utilizadas como ferramenta para detecção de leishmania em amostras clínicas de humanos e animais. Dentre as técnicas mais modernas utilizadas para o diagnóstico das leishmanioses, destacam-se as técnicas como PCR convencional, que permite a amplificação *in vitro* de sequências de DNA do parasito e apresenta-se como método bastante sensível e específico para detectar *Leishmania* spp. em ampla variedade de amostras biológicas (ALVAR et al., 2004). A versão quantitativa, PCR em tempo real (qPCR), é baseada no monitoramento dos ciclos de amplificação do DNA-alvo. Assim, pode ser utilizada para determinação da carga parasitária de forma acurada e sensível, permitindo a detecção de pequenas quantidades de DNA do parasito (GALLETTI et al., 2011).

A escolha dos primers utilizados nas reações de PCR e qPCR é de fundamental importância para a técnica e permite diferenciar espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (NEITZKE-ABREU et al., 2013). Nesse sentido, vários genes-alvos têm sido estudados, tais como aqueles que codificam a enzima glicose-6-fosatodesidrogenase, as proteínas do choque térmico, a polimerase-alfa, a subunidade ribossomal 18S (BEZERRA-VASCONCELOS et al.,

2011), a MTHD (proteína similar à metilenotetrahidrofolato desidrogenase), a RNase III, além do próprio DNA não-cromossomal de cinetoplasto, kDNA (RODRIGUES et al., 2014).

O diagnóstico da leishmaniose em cães e humanos é baseado em achados clínicos e testes laboratoriais, especialmente parasitológico, imunológico e/ou molecular (ALVES E BEVILACQUA, 2004). No contexto da prática clínica, diante da diversidade de sinais clínicos possíveis na leishmaniose visceral canina, os testes rápidos imonocromatográficos tipo Dual Path Platform (DPP) são amplamente utilizados para triagem de pacientes. Contudo, o diagnóstico definitivo deve, adicionalmente, ser amparado pela realização de titulação de anticorpos por imunoabsorção enzimática (ELISA) ou através de PCR. Tanto a PCR convencional, quanto a qPCR, têm permitido a identificação da espécie de *Leishmania* em questão, e, conseqüentemente, o direcionamento das devidas ações epidemiológicas de controle e adequação ao tratamento utilizado.

Nesse contexto, uma estratégia metodológica ideal para diagnóstico da LV em cães e humanos deve ser capaz de aliar alta sensibilidade, especificidade de detecção e praticidade de aplicação. Para tanto, a detecção do DNA do parasito é condição especialmente importante para adequada sensibilidade diagnóstica e a possibilidade de quantificação para determinação da parasitemia no paciente é desejável e útil em diversas circunstâncias clínicas. Assim, a presente pesquisa tem por objetivo geral descrever e comparar a sensibilidade de uma estratégia de qPCR no diagnóstico da LV em pacientes caninos e humanos.

## METODOLOGIA

### 1. Material biológico e ética

As amostras biológicas (sangue periférico e medula óssea) de pacientes humanos (n=17) foram cedidas pelo Departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará e fazem parte de projeto aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Ceará em 04 de fevereiro de 2016 (CAAE n.52626116.8.0000.5054) e pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas (CAAE n.52626116.8.3001.5044). Todos os pacientes eram sintomáticos e apresentaram resultado positivo para leishmaniose visceral através de teste imunocromatográfico rápido tipo DPP (Dual Path Platform, CVL, Biomanguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) baseado em rK39 (antígeno recombinante 39 de *Leishmania infantum*).

As amostras biológicas caninas (n=6) foram oriundas de triagem de 42 pacientes assintomáticos, ou com queixas clínicas diversas, foram oriundas do Centro de Medicina

Veterinária da UNIFAMETRO. Apenas as amostras dos pacientes que apresentaram resultado positivo para leishmaniose visceral através de teste rápido imunocromatográfico Alere (Dual Path Platform, Alere, São Paulo, Brasil) baseado em rK39 (antígeno recombinante 39 de *Leishmania infantum*) foram usados no presente estudo. Um volume de 3mL de sangue periférico foi coletado de cada espécime, através de punção venosa jugular, em tubo contendo heparina. As amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração do DNA. O presente projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética para uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (n. 0753797/2018).

## 2. Avaliação clínica dos pacientes caninos

Os pacientes caninos foram submetidos a exame clínico completo, incluindo inspeção geral dermatológica, oftalmológica e da cavidade bucal. Dados clínicos do paciente relevantes para a presente pesquisa foram registrados. Todos os pacientes foram submetidos a coleta de sangue periférico através de venopunção cefálica. As amostras foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até processamento na Unidade de Pesquisa em Genética Molecular (UPGeM) da UNIFAMETRO.

## 3. Extração de DNA

As amostras de DNA humano e canino foram obtidas através de protocolo, baseado em ligação do DNA total em resina de sílica, utilizando o Purelink Genomic DNA Mini kit (Invitrogen, Carisbad, USA).

No total, 4 ml de amostras de sangue venoso periférico e 2 ml de amostras de aspirado de medula óssea foram coletadas em tubos contendo EDTA e transportadas para o Laboratório de Imunologia Médica da Universidade Federal do Ceará, conforme manual de procedimentos de controle, acondicionamento e transportes de amostras biológicas (LACEN-CE, 2020). As amostras de sangue periférico foram submetidas a lise osmótica eritrocitária com solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,13M e  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,001M. Os leucócitos obtidos foram lavados duas vezes solução tampão salina e submetidos a extração de DNA.

Amostras de leucócitos humanos ou de sangue total canino (200 $\mu\text{L}$ ) foram acrescidas de 20 $\mu\text{L}$  de Proteinase K e 20 $\mu\text{L}$  de RNase A (ambos a 20 mg/mL) e incubado por 2min em temperatura ambiente. Após adição de 200 $\mu\text{L}$  de Purelink Genomic Lysis Buffer, incubação por 10 min a  $55^{\circ}\text{C}$  e adição de 200 $\mu\text{L}$  de etanol a 100%, o volume total foi transferido para a resina e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e a resina foi lavada com 500 $\mu\text{L}$  de solução tampão de lavagem-1 e com 500 $\mu\text{L}$  de solução tampão de lavagem-2. Cada amostra de DNA foi eluída com 50 $\mu\text{L}$  de água livre de nucleases. O DNA foi quantificado por espectrofotometria com

Picodrop (Picodrop, UK).

#### 4. Reações de PCR em tempo real (qPCR)

Cada reação de amplificação por PCR em tempo real consistiu em um volume total de 25µL, contendo 12,5µL Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA), 2,5µL primers (concentração final variando de 0,6 a 1,0µM), 1µL de amostra de DNA e 9µL água ultrapura. As reações de PCR foram realizadas no termociclador QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA) e a ciclagem térmica consistiu em incubação inicial a 95° C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação a 95° C por 15 segundos e 60° C por 60 segundos. A curva de *melting* dos *amplicons* foi traçada através de procedimento padrão.

As detecções de *L. infantum* nas amostras dos pacientes caninos e humanos foram realizadas reações de qPCR utilizando os primers apresentados na **Tabela 1**. A amplificação do DNA de kinetoplasto (kDNA) do parasito com os upkDNA-SE e upkDNA-AS (OLIVEIRA et al. 2019). Os controles das reações foram feitos através da amplificação de gene endógeno, mtDNA canino, utilizando os primers Dogmt1-SE e Dogmt1-AS (PEREIRA et al., 2019). DNA de *L. infantum* (500.000 leish/µL) foi utilizado como controle exógeno. Os parâmetros de Eficiência e Linearidade ( $R^2$ ) das amplificações foram calculados pelo software QuantStudio Design&Analysis Software v.1.4.2 (Thermo Fisher Scientific, USA).

**Tabela 1.** Primers para amplificação de kDNA e DNA mitocondrial em humanos e cães por qPCR.

Nome do primer	Sequência 5'-3'	Tamanho do produto (pb)
upkDNA-SE	GGGGGTGTCGTAAATTCTGGA	79
upkDNA-AS	CCCGGAGGAAGAGAAAAGTT	
Dogmt-SE	CTCTTGCTCCACCATCAGCA	145
Dogmt-AS	GCACGACGTACATAGGGGAG	
Hmt2-SE	AATCATACAAAGCCCCCGCA	162
Hmt2-AS	TGGGGTTAGCGATGGAGGTA	

#### 5. Curvas padrão de amplificação de kDNA

O par de primers upkDNA foi testado quanto ao seu limite de detecção de DNA para diagnóstico da LV canina e humana, na concentração de 1µM. Assim, as sensibilidades das amplificações foram analisadas através de curvas padrão construídas por diluição em série de DNA padrão de *L. infantum* (equivalente a 500.000 leishmanias/uL), misturado com DNA canino (16µg/uL) ou DNA humano (96µg/uL), obtidos como descrito anteriormente para os pacientes.



Adicionalmente, os parâmetros das curvas como Eficiência e Linearidade ( $R^2$ ) foram avaliados qualitativamente.

## 6. Comparação de qPCR e testes rápidos DPP para diagnóstico de leishmaniose visceral

Amostras de soro dos 6 pacientes caninos foram adicionalmente submetidas a teste sorológico rápido imunocromatográfico VetCheck (TECSA Laboratórios LTDA, Brasil), baseado em rK39 (antígeno recombinante 39 de *Leishmania infantum*). Para tanto, foram utilizados 20 $\mu$ L de soro e seguindo-se as orientações do fabricante.

## 7. Análise de dados

As reações de qPCR foram avaliadas através de análise das curvas de amplificação dos genes e de *melting* dos amplicons obtidos. Valores de threshold cycle (Ct) foram determinados automaticamente no QuantStudio Design&Analysis Software v.1.4.2 (Thermo Fisher Scientific, USA). Os valores de Ct (*Threshold cycle*) e Tm (*Melting temperature*) foram expressos em média  $\pm$ d.p.

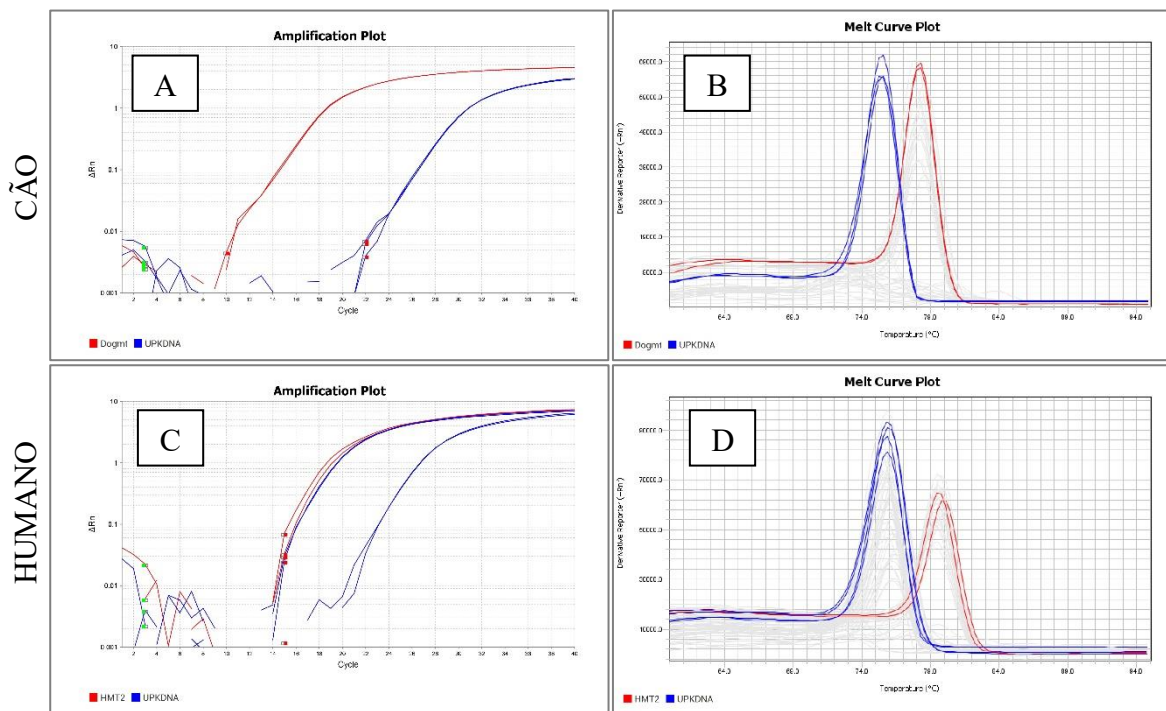
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na presente investigação, pacientes caninos, com ou sem sintomatologia compatível com leishmaniose visceral, foram atendidos no Centro de Medicina Veterinária da UNIFAMETRO. Um total de 6 pacientes que apresentaram resultado positivo no teste imunocromatográfico CVL (DPP1, **Tabela 2**), exibiam sinais clínicos variáveis e foram adicionalmente submetidos a teste de qPCR e outro teste imunocromatográfico VetCheck (DPP2). Constatou-se que 83,3% (5/6) dos pacientes apresentaram resultado positivo no teste DPP2 (**Tabela 3**) e apenas 16,7% (1/6), no qPCR. O paciente 05 apresentou quadro clínico geral ruim e sintomatologia clínica compatível com estado avançado da doença: emagrecimento, epistaxe, paresia dos membros pélvicos, descamação dérmica, lesão auricular e anúria. Os demais pacientes apresentavam quadro clínico geral bom.

Diferentes metodologias vêm sendo utilizadas para diagnóstico das leishmanioses, como métodos sorológicos, imunoabsorção enzimática (ELISA), etc. No entanto, as abordagens sorológicas possuem a limitação oriunda de possibilidade de reação cruzada (SRIVIDYA, et al., 2012). Assim, a existência de diversidade na resposta sorológica e a existência de outras patologias acometendo o paciente podem levar a presença a resultados falso-positivos nos testes (ELMAHALLAWY et al., 2014). Avanços constantes na biologia molecular permitiram seu uso

crescente como uma ferramenta no diagnóstico do calazar, com as vantagens de alta sensibilidade e especificidade.

A **Figura 1** apresenta as curvas de amplificação de kDNA e DNA mitocondrial, bem como as curvas de *melting* dos produtos de qPCR, obtidas a partir de amostras do paciente canino 05 e de dois pacientes humanos (com a maior e a menor carga parasitária sanguínea dentro do grupo de 17 pacientes estudado). Os valores de carga parasitária (**Tabela 4**), para amostras de sangue e medula óssea, foram calculados a partir das curvas obtidas para upKDNA (**Figura 2**).

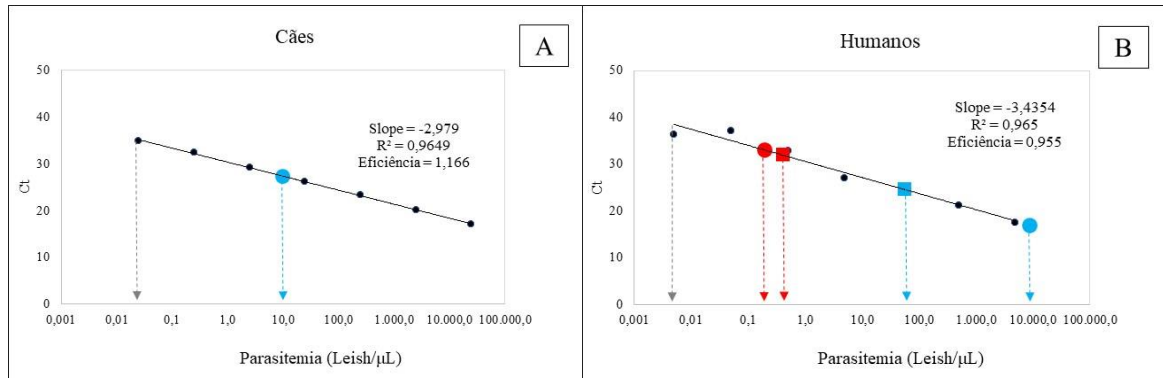


**Figura 1:** Amplificações de kDNA e DNA mitocondrial em amostras de sangue periférico caninas (A e B) e humanas (C e D). As amplificações de DNA mitocondrial estão representadas por Dogmt ou Hmt2, para cão e humano, respectivamente. As plotagens das amplificações, em escala logarítmica estão apresentadas nas imagens A e C. As curvas de *melting* dos produtos de qPCR estão apresentadas nas imagens B e D. Amplificações do kDNA e do DNA mitocondrial estão representadas em azul e em vermelho, respectivamente.

O protocolo de qPCR desenhado no presente estudo permitiu a detecção de DNA equivalente a 0,025 leishmanias/ $\mu$ L de sangue canino (ou 25 parasitos por mililitro de sangue) e 0,005 leishmanias/ $\mu$ L de sangue humano (ou 5 parasitos por mililitro de sangue), como observado na **Figura 2**. Essa elevada sensibilidade se deve ao fato de o gene amplificado estar presente no kDNA de miniciclo, que em média está presente em cerca de 10.000 cópias por parasito (BREWSTER et al., 1998). O valor de carga parasitária estimada para o paciente canino foi de  $9,75 \pm 0,11$  leishmanias/ $\mu$ L de sangue (média  $\pm$  d.p., Tabela 4), oriunda de valor de Ct de

27,40±0,01 para kDNA. Dentre os pacientes humanos, 95,1% (16/17) apresentaram resultado positivo no teste de qPCR (Tabela 3), com valores de carga parasitária variando de 0,39±0,28 a 8.640,08±226,99 leishmanias/μL (média±d.p., Tabela 4) em amostras de sangue periférico, e de 0,27±0,21 a 52,61±5,62 leishmanias/μL em medula.

**Figura 2.** Curvas-padrão de amplificação de kDNA de *L. infantum* por qPCR em amostras de



sangue periférico canino (A) e humano (B). A sensibilidade de amplificação (setas cinzas) foi equivalente à detecção de 0,025 leishmania/uL em cães e 0,005 leishmanias/uL em humanos. Os parâmetros das curvas (Slope, R<sup>2</sup> e Eficiência) estão apresentados nas imagens. Os valores oriundos as ampliações de amostras de DNA de sangue periférico (marcadores e setas azuis) de paciente canino e de pacientes humanos estão indicados. Os valores oriundos as ampliações de amostras de DNA de medula óssea (marcadores e setas vermelhas) de pacientes humanos estão indicados.

**Tabela 2.** Comparação entre testes imunocromatográficos e molecular (qPCR) para detecção de *Leishmania infantum* em amostras de pacientes caninos e humanos.

N. Paciente	DPP1	DPP2	qPCR	Sinais clínicos
05	Positivo	Positivo	Positivo	Emagrecimento, epistaxe, paresia dos membros pélvicos, descamação dérmica, lesão auricular, anúria.
12	Positivo	Positivo	Negativo	Anorexia, ulceração nasal e bucal.
19	Positivo	Negativo	Negativo	Artralgia, opacificação córnea, descamação dérmica, lesão auricular, febre.
27	Positivo	Positivo	Negativo	Nódulo mamário, respiração paroxística inspiratória.
31	Positivo	Positivo	Negativo	Êmese, tosse, dispnéia.
40	Positivo	Positivo	Negativo	Lesão auricular, prurido, otite.

DPP1 e DPP2: Testes imunocromatográficos produzidos pelos laboratórios Alere e Tecsca, respectivamente.

Os resultados obtidos tanto em cães como em humanos reforçam a elevada sensibilidade do protocolo de qPCR apresentado no presente estudo. Destaca-se ainda a elevada acurácia do protocolo, evidenciada pela estimativa de quantificação realizada com amostra padrão de DNA equivalente a 500.000 leishmania/μL, a qual teve concentração estimada em



557.761,52±36.305,67 na curva traçada para cães e de 665.768,15±37.675,89 na curva traçada para humanos.

**Tabela 3.** Comparação entre testes imunocromatográficos e molecular (qPCR) para detecção de *Leishmania infantum* em amostras de pacientes caninos e humanos.

Amostra	DPP1	DPP2	qPCR
Caninas (n=6)	6 (100%)	5 (83,3%)	1 (16,7%)
Humanas (n=17)	17 (100%)	NR	16 (95,1%)

DPP1 e DPP2: Testes imunocromatográficos produzidos pelos laboratórios Alere e Tecs, respectivamente. NR: Não realizado.

Abordagens com uso de PCR tempo real (qPCR) vêm sendo ferramentas cada vez mais importantes no diagnóstico molecular da leishmaniose visceral canina e humana, podendo utilizar amostras clínicas como: sangue, soro, fragmentos de pele, medula óssea, líquor, amostra conjuntival e aspirado de linfonodo (QUARESMA et al., 2009). Contudo, os testes imunocromatográficos tipo DPP são amplamente utilizados na rotina clínica, devido à facilidade técnica e velocidade de execução. Os dispositivos disponíveis comercialmente no Brasil são baseados na detecção de anticorpos anti-K39 (antígeno 39 de *Leishmania infantum*), com a proteína recombinante imobilizada no dispositivo. Na presente investigação, o nível de discordância entre os resultados de qPCR foi destacadamente elevado em cães (1/6), quando comparados a humanos (16/17). Destaca-se que os pacientes humanos eram todos sintomáticos para o calazar, enquanto os pacientes caninos procuraram atendimento com sintomatologia diversa.

**Tabela 4.** Quantificação de leishmania em amostras caninas (sangue) e humanas (sangue e medula) através de qPCR.

Parâmetro	Cão (média±d.p.)	Humano (média±d.p.)			
		Sangue		Medula	
Ct upKDNA	27,40±0,01	17,03±0,04	32,20±1,18	24,65±0,16	32,80±1,32
Parasitemia (Leishmania/µL)	9,75±0,11	8.640,08±226,99	0,39±0,28	52,61±5,62	0,27±0,21

d.p.: desvio padrão.

Apesar de não termos realizado exame parasitológico direto em aspirado medular, nossos achados estão de acordo com aqueles descritos por REITHINGER et al. (2002). Os autores registraram especificidade para testes imunocromatográficos tipo DPP variando de 61 a 75% e sensibilidade de 72 a 77%, em comparação com especificidade de 100% para ELISA e PCR e sensibilidade de 71 a 88% e 51 a 64% para ELISA e PCR, respectivamente. Das amostras de campo testadas, 92 de 175 (53%), 65 de 175 (37%) e 47 de 175 (27%) foram positivas por DPP, ELISA e PCR, respectivamente.

No presente estudo, a 83,3% dos pacientes caninos apresentaram teste positivo em 2 testes DPP baseados em rK39. Segundo ELMAHALLAWY et al. (2014), referente a testes realizados com pacientes humanos, a discordância entre testes DPP baseado em rK39 varia entre 79 e 89%. Os autores justificam que essas discrepâncias podem ser devidas a diferenças nas respostas de anticorpos observadas em diferentes grupos étnicos. O ensaio imunocromatográfico baseado em rK39 apresenta-se como método versátil na previsão de infecção aguda, com formato fácil de usar em campo, rápido (15 a 20 minutos), barato e oferece resultados reprodutíveis.

**Tabela 5.** Quantificação em amostra padrão de DNA de 500.000 leishmania/ $\mu$ L realizada em curvas-padrão para cães e para humanos.

Parâmetro	Concentração (Leishmania/ $\mu$ L)	
	Curva de Cães	Curva de Humanos
Média	557.761,52	665.768,15
d.p.	36.305,67	37.675,89

Quando trabalhando exclusivamente com pacientes assintomáticos humanos, OWEN et al. (2021) encontrou cerca de 10,1% (7/720) de pacientes positivos por qPCR, em regiões endêmicas de Bangladesh. Tais achados são similares aos do presente estudo, onde 16,7% dos pacientes caninos com resultado sorológico positivo pelo teste DPP apresentaram reação de qPCR positiva.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O protocolo de qPCR desenhado no presente estudo permite a detecção 0,025 leishmanias/ $\mu$ L de sangue canino e 0,005 leishmanias/ $\mu$ L de sangue humano. Apenas 16,7% (1/6) dos pacientes caninos com sintomatologia clínica diversa e previamente triados como positivos para calazar por teste imunocromatográfico tipo DPP baseado em antígeno rK39, apresentou resultado positivo por qPCR, tendo parasitemia estimada em  $9,75 \pm 0,11$  leishmanias/ $\mu$ L de sangue (média $\pm$ d.p.). Dentre os pacientes humanos, sintomáticos para calazar, 95,1% (16/17) apresentaram resultado positivo no teste de qPCR, com valores de carga parasitária variando de  $0,39 \pm 0,28$  a  $8.640,08 \pm 226,99$  leishmanias/ $\mu$ L (média $\pm$ d.p.) em amostras de sangue periférico. Assim, a presente pesquisa registra o desenvolvimento de uma estratégia de PCR em tempo real com elevada sensibilidade para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral, tanto no cão, quanto no homem. Essa condição é especialmente relevante pois, muitas vezes, o acesso à carga parasitária por qPCR, para acompanhamento de progressão da patologia, se faz necessária ou desejável. Finalmente, este estudo evidencia a necessidade de investigação da sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos de calazar canino, especialmente em pacientes assintomáticos.

## REFERÊNCIAS

- ALVAR, J.P.E. **Las Leishmaniasis. De la biología al control.** Junta de Castilla, p. 20, 51, 59, 103, 104, León, 1997.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. **Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemiologia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997.** Caderno de Saúde Pública, v. 20, n.1, p.259-265, 2004.
- BATISTA, R.I., et al. **Methodological strategies for transgene copy number quantification in goats (Capra hircus) using real-time PCR.** Biotechnology Progress, v.30, n.6, p.1390-400, 2014.
- BEZERRA-VASCONCELOS, D. R., et al. **Real-time PCR to assess the Leishmania load in Lutzomyia longipalpis sand flies: Screening of target genes and assessment of quantitative methods.** Experimental Parasitology, v. 129, p. 234–239, 2011.
- BRASIL, Ministério da Saude 2006 – **Manual de vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral – Secretaria de Vigilância em Saude – Departamento de vigilância e epidemiologia- 3a imp.** Brasília – DF.
- BREWSTER, S. **Kinetoplast DNA Minicircle Database.** Parasitology Today, v. 14, no. 11, p. 437-438, 1998.
- DANTAS-TORRES F. **Leishmania infantum versus Leishmania chagasi: do not forget the law of priority.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 101, p. 117–118, 2006.
- ELMAHALLAWY, E.K. et al. **Diagnosis of leishmaniasis (review).** Journal of Infection in Developmental Countries, v.8, n.8, p.961-972, 2014.
- GALLETI, E., et al. **Development of a minor groove binding probe based real-time PCR for the diagnosis and quantification of Leishmania infantum in dog specimens.** Research in veterinary science, v. 91, n. 2, p. 243-245, 2011.
- NEITZKE-ABREU, Herintha Coeto et al. **Detection of DNA from Leishmania (Viannia): accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis.** PloS one, v. 8, n. 7, p. e62473, 2013.
- OWEN et al. **Detection of asymptomatic Leishmania infection in Bangladesh by antibody and antigen diagnostic tools shows an association with post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) patients.** Parasites Vectors, v. 14, n. 111, p. 1-7, 2021.
- OMS (Organização Mundial de Saúde). **Health topics: Leishmaniasis.** Disponível em: <<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>> Acesso em: 02 de maio de 2016.
- PFAFFL, M. W. **Quantification strategies in real-time PCR.** Chapter3. Quantification strategies in real-time PCR. 87-112p., 2004.
- QUARESMA, P. F., et al. **Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of Leishmania species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR.** Acta Tropica, v.111, p.289-294, 2009.
- REITHINGER et al. **Rapid Detection of Leishmania infantum Infection in Dogs: Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR.** Journal of Clinical Microbiology, v.40, n.7, p. 2352–2356, 2002.
- RODRIGUES, A. C. M. et al. **Epidemiological survey of Lutzomyia longipalpis infected by Leishmania infantum in an endemic area of Brazil.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 23, n. 1, p. 55-62, 2014.
- RUTLEDGE, R.G., CÔTÉ, C. **Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves.** Nucleic Acids Research, v.31, p.e93, 2003.
- SRIVIDYA, G. et al. **Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade.** Parasitology research, v.110, n.3, p.1065-78, 2012.