



O USO DE qPCR NO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Antonia Emyle Santos Sodré^{1*}, Ana Beatriz Leite Cirqueira Ferros¹, Anna Letícia Pinto Silva², Rafael Jefferson dos Santos Costa², Sarah Cristina da Silva Sousa², Ellainy Maria Conceição Silva³ e Alcina Vieira de Carvalho Neta⁴.

¹Discente no Curso de Medicina Veterinária – Universidade Estadual do Maranhão – UEMA – São Luís/MA – Brasil – *Contato: antoniemyle2004@gmail.com

²Discente do programa de pós-graduação em ciência animal – Universidade Estadual do Maranhão – UEMA – São Luís/MA – Brasil

³Médica Veterinária do Hospital Veterinário Universitário (HVU – São Luís/MA) – São Luís/MA – Brasil

⁴Docente do Curso de Medicina Veterinária – Universidade Estadual do Maranhão – UEMA – São Luís/MA – Brasil

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença de caráter zoonótico, causada pelo protozoário do gênero *Leishmania spp.*, sendo a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) uma das mais preocupantes no Brasil pelo seu caráter endêmico em todas as cinco regiões do País.³ Este protozoário tem como principal característica ser intracelular obrigatório, apresentando tropismo pelas células imunológicas do hospedeiro, levando a quadros crônicos da doença.⁵ A *Leishmania spp.* é transmitida por fêmeas de flebotômíneos, popularmente conhecidas como mosquito-palha, que adquirem o protozoário ao se alimentarem do sangue de animais infectados e o transmitem a hospedeiros suscetíveis em repastos subsequentes.⁵

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) é desafiador devido aos sinais clínicos inespecíficos e à elevada frequência de animais assintomáticos, que atuam como reservatórios e contribuem para a manutenção da cadeia de transmissão do protozoário.³

O protocolo recomendado pelo Ministério da Saúde para inquéritos sorológicos em cães consiste na triagem pelo teste rápido imunocromatográfico DPP® (Dual Path Platform) e confirmação pelo teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).¹

As metodologias baseadas em biologia molecular também têm se mostrado altamente eficazes na identificação de diversas afecções, destacando-se pela elevada taxa de acerto e confiabilidade diagnóstica. Entre essas, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é considerada uma das mais versáteis da área. Dentre suas variações, destaca-se a PCR em tempo real (qPCR), amplamente empregada na pesquisa científica e na detecção de patógenos.⁶ Além disso, é amplamente utilizada na rotina diagnóstica veterinária, devido à sua precisão na detecção e quantificação de patógenos, como a *Leishmania*.² Diante disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar a aplicação da qPCR no diagnóstico de LVC.

METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho foram utilizados artigos científicos obtidos a partir do banco de dados de pesquisa científica google acadêmico. As buscas foram feitas usando palavras-chave como *Leishmania*, leishmaniose, PCR, qPCR, técnicas moleculares e semelhantes.

RESUMO DE TEMA

A LVC é causada pelo protozoário da espécie *Leishmania chagasi* (syn = *Leishmania infantum*), em que o cão é seu principal reservatório urbano.⁴

O diagnóstico da LVC pode ser desafiador, devido aos sinais clínicos inespecíficos da doença e pelo grande número de animais assintomáticos, que acabam tornando-se reservatórios para a disseminação da enfermidade para outros animais.³

O diagnóstico precoce da doença é fundamental para o tratamento e controle da disseminação do protozoário. Os testes de detecção mais utilizados na rotina veterinária são os testes sorológicos como o RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) e o ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), que se baseiam em reações antígeno-anticorpo.⁵

Os testes sorológicos na LVC podem falhar em identificar a infecção, especialmente em cães na fase pré-patente, sem soroconversão ou que se tornam soronegativos mesmo estando infectados.⁷ Nesses casos, exames complementares podem auxiliar no diagnóstico, especialmente em animais com suspeita clínica e resultados sorológicos inconclusivos.³

Os testes parasitológicos também são muito utilizados nos diagnósticos LVC. O exame é feito baseando-se na observação de formas amastigotas de *Leishmania* encontradas em lâminas de aspirados de medula óssea e linfonodos, ou outros tecidos em lâmina.⁴ Esse método apresenta alta especificidade, porém, a sensibilidade é variável, dependendo da qualidade da amostra, capacidade técnica do patologista e a qualidade dos corantes utilizados.³

Métodos moleculares como a cPCR e a qPCR se destacam pela elevada especificidade, frequentemente superior a 95%. No entanto, sua

sensibilidade pode sofrer variações significativas, influenciada pelo tipo de amostra analisada e pelo alvo molecular escolhido. Essas técnicas, especialmente a qPCR, têm ganhado destaque e se tornado cada vez mais utilizadas devido à sua rapidez, ampla faixa dinâmica e menor risco de contaminação cruzada.² A qPCR depende de uma análise de fatores fluorescentes que ocorrem durante a amplificação. A fluorescência pode ser feita utilizando corantes fluorescentes intercalados como SYBER Green ou sondas fluorescentes como TaqMan.²

A sensibilidade da qPCR para animais assintomáticos infectados é bem maior do que testes sorológicos e parasitológicos. A qPCR também consegue permitir a quantificação de parasitas com base na curva de calibração, e permite estimar a carga parasitária de *Leishmania* por ml nas amostras analisadas.² A técnica é capaz de identificar traços residuais de DNA do parasita, mesmo na ausência de evidências da infecção em exames microscópicos diretos, a técnica ainda consegue detectar resíduos de DNA parasitário, contribuindo para a identificação de falhas tanto no diagnóstico quanto no acompanhamento terapêutico.⁸

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico de leishmaniose visceral canina por meio de qPCR se mostra promissor, e apresenta-se como uma boa alternativa para a montagem de tratamentos personalizados para cada paciente, analisando sua adaptação aos fármacos ministrados. A qPCR também pode ser uma boa estratégia para a montagem de perfis epidemiológicos da leishmaniose no Brasil, avaliando o percentual da taxa de infecção dos animais e a carga parasitária, para a elaboração de estratégias sanitárias no diagnóstico e controle desta zoonose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da epidemiologia em Serviços. **Leishmaniose visceral**. In. Guia da vigilância em saúde [recurso eletrônico]. 3. Ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde. P. 503-522, 2019.
2. Casteli, G.; Bruno, F.; Reale, S.; Catanzaro, S.; Valenza, V.; Vitale, F. **Diagnóstico molecular de leishmaniose: quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real com alta sensibilidade**. Pathogens, v. 10, n.7, p.865-865, 2021.
3. Costa, G.P.; Silva, D.P.C.; Rocha, D.O.A.C.; Teixeira, P.H.G. **Métodos de Diagnóstico da Leishmaniose Canina: Revisão de Literatura**. Saber Científico, v. 9, n. 2, p. 95-104, 2020.
4. Freitas, A.L.; Kinoshita, A.S.; Pimentel, B. Z.; Malheiros, D.A.; Oliveira, E. R.; Nascimento, G. Y. S.; Júlio, J. B.; Paes, J.M.; Amorim, T.M.S.; Araújo, T.L.; Longo, B.F.P. **Leishmaniose visceral canina: Revisão**. Pubvet, v. 16, p. 1-20, 2022.
5. Mergen, M.E.; Souza, M.M. **Leishmaniose Visceral canina, métodos diagnósticos e tratamento na atualidade – Revisão de literatura**. Revista JRG de Estudos Acadêmicos, v. 6, n. 13, 2023.
6. Pabinger, S.; Rodiger, S.; Kriegner, A.; Vierlinger, K.; Weinhausel, A. **A Survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. Biomolecular Detection and Quantification**, v.1, n.1, p. 23-33, 2014.
7. Silva, S. R. **Avaliação da infeciosidade em cães vacinados com Leish-Tec® (Hertape Saúde Animal S/A) para Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.
8. Wu, Y., Tian, X., Song, N., Huang, M., Wu, Z., Li, S., Yang, G. **Application of quantitative PCR in the diagnosis and evaluating treatment efficacy of leishmaniasis. Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 581639, 2020.