



VASSALLO, Kaline Ribeiro de Almeida¹; **FREITAS**, Gustavo Costa²; **SOUSA**, Guilherme Soares de³, **SANTOS**, Helcileia Dias⁴ **BARBOSA**, Silvia Minharro⁵

RESUMO

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, com as espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* sendo as mais prevalentes em casos humanos. Métodos tradicionais de diagnóstico, como microscopia e cultura, apresentam limitações, o que torna a PCR uma alternativa promissora devido à sua sensibilidade e especificidade. Este estudo revisa sistematicamente os primers mais eficazes para detecção dessas espécies em técnicas de PCR, para a detecção de *L. infantum* e *L. braziliensis*, identificando aqueles que melhoram a acurácia do diagnóstico e contribuem para o monitoramento de doenças em humanos. Um total de 634 artigos foram avaliados por meio de uma revisão sistematizada, dos quais 8 atenderam aos critérios de inclusão. A análise focou em técnicas como PCR convencional, Nested PCR e qPCR, comparando-as com métodos tradicionais de diagnóstico. Os primers BHUL18S para *L. infantum* e

1 Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC/PIBITI). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Integradas, Faculdade de Ciências da Saúde. e-mail: kaline.vassallo@ufnt.edu.br

2 Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC/PIBITI). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Integradas, Faculdade de Ciências da Saúde. e-mail: gustavo.freitas@ufnt.edu.br

3 Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC/PIBITI). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Integradas, Faculdade de Ciências da Saúde. e-mail: @ufnt.edu.br

4 Professora Doutora do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), co-orientadora do projeto de extensão. helcileia.santos@ufnt.edu.br

5 Professora Doutora do Centro de Ciências Integradas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), coordenadora do projeto de extensão. Silvia.barbosa@ufnt.edu.br



ITS1 e kDNA para *L. braziliensis* se destacaram por sua alta sensibilidade e especificidade melhoraram a acurácia diagnóstica e facilitou a identificação de *L. infantum* e *L. braziliensis*, contribuindo para diagnósticos precoces e precisos. Evidenciando a importância da PCR no manejo clínico das leishmanioses.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. Leishmaniose tegumentar. Primers. PCR.

I. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é uma zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos por flebotomíneos em áreas quentes, afetando o sistema fagocítico dos mamíferos, onde se multiplicam nos macrófagos (Neves et al., 2004; Veronessi; Focaccia, 2015). A identificação das espécies é difícil pela ausência de diferenciação morfológica, sendo dependente de fatores epidemiológicos e clínicos (Gomes, 2007). Técnicas moleculares, como a PCR, apresentam alta sensibilidade ao amplificar sequências específicas de DNA (Noletto et al., 2017). Este estudo busca identificar primers mais sensíveis e específicos para detectar DNA de *Leishmania*, diferenciando *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*, visando ao diagnóstico precoce e ao monitoramento da doença. O trabalho propõe uma revisão sistemática para identificar os primers mais eficazes no diagnóstico dessas doenças, e o mesmo encontra-se inserido no eixo de ciências biológicas e saúde, com ênfase em estudos epidemiológicos e moleculares.

II. BASE TEÓRICA

A base teórica da pesquisa sobre métodos moleculares de diagnóstico da Leishmaniose foi fundamentada em diversos autores e diretrizes reconhecidas. A metodologia seguiu o Handbook da Colaboração Cochrane (Higgins & Thomas, 2022), que orienta revisões sistemáticas, e foi complementada pelas Diretrizes do Ministério da Saúde do Brasil (Brasil, 2014), adaptando-se ao contexto nacional. Essas fontes



essenciais para desenvolver uma revisão sistemática abrangente, desde a formulação da pergunta de pesquisa até a análise de dados e avaliação de viés.

A revisão focou em estudos sobre PCR (*Polymerase Chain Reaction*) como técnica principal para detectar *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*. Autores como Srivastava et al. (2011) e Mouttaki et al. (2014) analisaram a eficácia de diferentes primers, estabelecendo uma base sólida para a escolha dos melhores marcadores genéticos. Além disso, pesquisas de Adams et al. (2018) e Nateghi Rostami et al. (2020) discutiram a precisão e inovações em métodos como qPCR e LAMP, aprimorando as práticas diagnósticas.

Ferramentas como QUADAS-2 (Whiting, 2011) foram utilizadas para avaliar a qualidade metodológica dos estudos, garantindo a confiabilidade dos resultados. A pesquisa também se baseou nos estudos de Sampaio (2007) para a aplicação de testes estatísticos, possibilitando uma análise precisa da sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos. As revisões abordaram desde métodos de PCR e seus primers até comparações de sensibilidade, assegurando uma fundamentação teórica sólida para a metodologia proposta.

III. OBJETIVOS

O objetivo geral desta pesquisa é analisar e comparar a sensibilidade e especificidade dos métodos moleculares, especialmente o PCR, no diagnóstico da Leishmaniose em suas diferentes formas clínicas, visando identificar o método mais eficiente.

Objetivos Específicos:

1. Avaliar a eficácia dos primers usados nas técnicas de PCR para detecção de *Leishmania*; 2. Avaliar a sensibilidade e especificidade dos Primers encontrados; 3. Analisar a viabilidade de aplicar esses métodos em regiões com poucos recursos e 4. Identificar lacunas nos estudos atuais e sugerir melhorias nos métodos diagnósticos.



IV. METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada por meio de uma revisão sistemática, seguindo a metodologia estabelecida no Handbook da Colaboração Cochrane (Higgins & Thomas, 2022) e nas diretrizes do Ministério da Saúde (Brasil, 2014). O estudo foi registrado na base de dados online PROSPERO (número de registro: CRD42024522728). Com base no acrônimo PIRO (População, Teste índice, Padrão de referência, Outcome), orientou as perguntas norteadoras sobre os melhores primers para a detecção do DNA de *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*, bem como as variações das técnicas de PCR.

Foi realizada uma busca em bases eletrônicas, incluindo PubMed, EMBASE, SCIELO e BVS/LILACS. Os descritores utilizados para encontrar os artigos foram baseados em termos MeSH, como "L. braziliensis", "L. infantum", "Leishmaniasis", "Mucocutaneous" e "Visceral Leishmaniasis", combinados com operadores booleanos (AND/OR) e outros termos relacionados, como "PCR" e "molecular diagnostics".

O risco de viés dos artigos foi realizado com base na ferramenta QUADAS-2 (WHITING, 2011), que avalia a qualidade metodológica em quatro domínios: seleção de pacientes, teste índice, padrão de referência e fluxo de pacientes. Após a triagem, os dados foram extraídos e organizados em uma planilha, abordando aspectos como tipo de teste molecular, população estudada, método de leitura, tipo de amostra e especificidade e sensibilidade dos primers.

A amostra final foi composta por oito estudos que atenderam aos critérios estabelecidos. A análise dos dados envolveu a extração de informações sobre tipo de teste, população estudada, local e ano de realização, além da sensibilidade e especificidade dos primers utilizados. A análise estatística foi realizada para comparar a sensibilidade e especificidade dos primers, utilizando testes de frequência relativa e absoluta.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO



Os resultados da pesquisa revelaram uma diversidade significativa nos métodos de diagnóstico molecular utilizados para a detecção de *Leishmania*, com ênfase na análise de primers específicos. A revisão sistemática incluiu oito estudos, dos quais cinco abordaram *Leishmania braziliensis* e três focaram em *Leishmania infantum*. Os primers BHUL18S para *L. infantum* e ITS1 e kDNA para *L. braziliensis* se destacaram por sua alta sensibilidade e especificidade. As variantes de PCR, como o Nested PCR e a qPCR, mostraram um desempenho superior em relação à microscopia e cultura, proporcionando maior precisão no diagnóstico. A sensibilidade dos primers variou consideravelmente entre os estudos, com os melhores resultados alcançando até 95% em condições laboratoriais controladas, enquanto outros mostraram valores de sensibilidade abaixo de 70%.

A análise dos dados indicou que a especificidade dos métodos utilizados foi, em geral, alta, com a maioria dos estudos reportando taxas superiores a 90%. No entanto, foi observado que a especificidade pode ser influenciada pela presença de infecções concomitantes e pela qualidade das amostras biológicas, fatores que devem ser considerados ao interpretar os resultados.

Além disso, a discussão sobre os dados obtidos apontou para a necessidade de padronização dos métodos e primers utilizados, uma vez que a variação na sensibilidade e especificidade pode impactar diretamente no diagnóstico e no manejo clínico da leishmaniose. A literatura revisada sugere que a combinação de diferentes métodos de diagnóstico molecular pode aumentar a precisão na detecção de *Leishmania*, destacando a importância de estratégias multidisciplinares na pesquisa e no controle da doença. A continuidade de estudos comparativos e a aplicação de técnicas inovadoras, como a qPCR, podem contribuir significativamente para aprimorar as abordagens diagnósticas em áreas endêmicas.

VI. CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS



A revisão sistemática revelou a importância do diagnóstico molecular da Leishmaniose, além de aprofundar a compreensão sobre a eficácia dos primers. Os primers BHUL18S para *L. infantum* e ITS1 e kDNA para *L. braziliensis* se destacaram por sua alta sensibilidade e especificidade, porém, houve uma ausência de padronização de protocolos estudados que pode ter dificultado a extração de dados. E deixado lacunas de conhecimento, sugerindo futuras investigações. A experiência prática adquirida contribuiu significativamente para a formação acadêmica, reforçando a importância da pesquisa na busca por soluções inovadoras.

VII. REFERÊNCIAS

ADAMS, E. R. et al. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 7, 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Diretrizes Metodológicas: Elaboração de Revisão Sistemática e metanálise de estudos de Acurácia diagnóstica**. Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2014. 116p.

GOMES, Aparecida H. S. et al. PCR identification of Leishmania in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 144, n. 2007, p. 234–241, 2006.

MOUTTAKI, T. et al. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative Leishmania species in Morocco by using three PCR-based assays. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, 2014.

NEVES, David Pereira et al. **Parasitologia humana**. 11° ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 498 p.

NOLETO, R. V. et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pela técnica de PCR em sangue periférico em associação com os testes RIFI e ELISA em cães de Palmas, TO. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 2-6, 2017.



PROSPERO. **International prospective register of systematic reviews**, 2023. Disponível em: <https://www.crd.york.ac.uk/prospero/>. Acesso em 25 de mai. De 2023.

SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e19304, 2011.

VERONESI, Ricardo e FOCACCIA, Roberto. **Tratado de Infectologia**. 5° ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. 2489 p

WHITING, P. F. QUADAS-2: A revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. **Annals of Internal Medicine**, v. 155, n. 8, 529. 2011.

VIII. AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todos que contribuíram para a realização desta pesquisa. Agradeço especialmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Tocantins (FAPT) pelo apoio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho. Agradeço também aos professores e colegas da Universidade Federal do Norte do Tocantins, que compartilharam conhecimentos e orientações valiosas ao longo do processo. A todos que, de alguma forma, colaboraram com este projeto, meu muito obrigado.