

# Aplicação do diagnóstico molecular na detecção de leishmaniose visceral canina

Nathalia da Silva Avila<sup>1</sup>, Maria Lucia Rosa Rossetti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Biomedicina da Ulbra - Bolsista CNPq, <sup>2</sup>Professora-Orientadora dos Cursos de Biomedicina, Farmácia e Medicina da Ulbra, maria.rossetti@ulbra.br

## Resumo

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, acometendo principalmente cães domésticos, podendo causar danos nos órgãos internos do animal, como o baço, fígado, hemorragias intestinais, apatia, entre outros, com risco para outros animais e seres humanos em ambientes com o vetor transmissor do parasito. O diagnóstico é importante, porém difícil e os testes laboratoriais ainda não possuem a acurácia necessária para auxiliar em um tratamento adequado. Os testes imunológicos, que se baseiam na pesquisa de anticorpos, são os mais recomendados para o diagnóstico de LVC, no entanto, podem apresentar resultados falsos positivos e negativos. Assim, este estudo teve como objetivo padronizar um diagnóstico de LVC por PCR para a detecção de *Leishmania* em plasma de caninos. O DNA foi extraído por coluna de sílica e amplificado com iniciadores da região do kDNA do parasito. O fragmento amplificado foi analisado pela técnica de eletroforese.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral Canina; *Leishmania*; Testes Moleculares; Testes de imunodiagnóstico

## Abstract

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is caused by protozoa of the genus *Leishmania*, primarily affecting domestic dogs, potentially causing damage to internal organs such as spleen, liver, intestinal bleeding, apathy, among others, with risks to other animals and humans in environments where the parasite's transmitting vector is present. Diagnosis is crucial yet challenging, as current laboratory tests do not consistently offer the necessary accuracy to guide proper treatment. Immunological tests, based on antibody detection, are commonly recommended for CVL diagnosis but may yield false positive and false-negative results. Therefore, this study aimed to standardize a PCR-based diagnosis for CVL to detect *Leishmania* in canine plasma. DNA extraction was performed using silica columns, followed by amplification with primers targeting the parasite's kDNA region. The amplified fragment was analyzed by gel electrophoresis.

Keywords: Canine Visceral Leishmaniasis; *Leishmania*; Molecular Tests; Immunodiagnostic Test

## Introdução

A leishmaniose é uma doença endêmica em mais de 70 países da Ásia, Américas, Europa, África e Oriente Médio, atingindo principalmente zonas rurais e centros urbanos. Apresenta-se nas formas de Leishmaniose cutânea (LC), muco cutânea (LM) e visceral (LV),

a última sendo a forma mais letal da doença. Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) foram notificados um total de 1.105.545 casos de LC e LM no período de 2001 a 2021 e 69.665 casos de LV, uma média anual de 2.488 casos, com uma taxa de fatalidade de 8% (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2024). No Brasil em 2015, foram registrados

9.811 casos de LV com 506 mortes (BRASIL, 2024). Em um levantamento epidemiológico feito pelo Ministério da Saúde, de 2016 a 2020, que vide acompanhar a disseminação de doenças tropicais negligenciadas no Brasil, as leishmanioses visceral e tegumentar estão dentro das doenças que apresentaram maior sobreposição nas regiões endêmicas e vulneráveis<sup>3</sup>. A leishmaniose é causada por um protozoário flagelado do gênero *Leishmania*, transmitida pela picada das fêmeas de flebotomíneos, popularmente conhecidos como mosquito-palha (*Lutzomyia longipalpis*) (KAMHAWI, 2006). A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma zoonose que tem como principal reservatório os canídeos, principalmente cães domésticos (*Canis familiaris*), atuam como os principais reservatórios. Devido à convivência próxima com os seres humanos, esses animais representam um risco elevado de transmissão da doença. O vetor, ao se alimentar do sangue infectado do cão, pode posteriormente infectar humanos, configurando um risco significativo para a saúde pública (FAKHAR et al., 2022). O parasito manifesta-se em formas diferentes conforme o hospedeiro. Quando está no sistema digestivo do vetor, encontra-se na forma flagelada chamada de promastigota que, após a inoculação no mamífero hospedeiro, as promastigotas são absorvidas por células fagocíticas, onde transformam-se em uma forma imóvel com a redução do seu flagelo, chamado de amastigota (FAKHAR et al., 2022). A LVC apresenta lesões cutâneas, como descamação e eczema, pequenas úlceras rasas frequentemente nas orelhas, focinho, cauda e articulações e pelo opaco. Na fase mais avançada da doença, observa-se esplenomegalia, alopecia, dermatites, apatia, hemorragia intestinais, entre outras (BRASIL, 2014). A classificação segundo os sinais clínicos, podem ser: cães assintomáticos, oligossintomáticos ou sintomáticos. Após a infecção do animal, o aparecimento de sintomas vai depender da imunocompetência do animal. A forma assintomática da doença representa cerca de 40 a 60% de cães soropositivos, dessa forma, dificultando o diagnóstico (BRASIL, 2014). O diagnóstico de LVC é difícil de ser determinado, pois há uma grande porcentagem de cães assintomáticos ou oligossintomáticos, os sinais clínicos também podem ser semelhantes à

outras doenças infecciosas, e os testes de diagnóstico laboratoriais disponíveis são pouco sensíveis ou específicos (PALTRINIERI et al., 2016). As normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana (LVH) preconiza o uso de testes imunológicos como, a imunofluorescência indireta (RIFI) e o teste rápido imunocromatográfico para detectar a presença de anticorpos<sup>6</sup>. Há limitações em seus resultados, pois por se basear na pesquisa de anticorpos, depende do grau de parasitemia do animal, se o animal está ou não no período de janela imunológica e, pode haver casos de reação cruzada com outras doenças infecciosas (BRASIL, 2014). Além disso, os níveis de anticorpos podem permanecer positivos por longos períodos, mesmo após o tratamento, ou cura espontânea (PATIL et al., 2012). No exame parasitológico, a realização de punções hepática, linfonodos, esplênica, de medula óssea ou biópsia e escarificação da pele, pode identificar a presença do parasito na sua forma natural. No entanto, esses métodos são invasivos e demoram um certo período para fornecer resultados, o que pode ser impraticável em situações em que o tempo é crítico (BRASIL, 2014). O diagnóstico de LVC é realizado normalmente utilizando teste imunológico, principalmente o teste imunocromatográfico, com utilização do antígeno recombinante rK39 (BOELAERT et al., 2014; GRIENSVEN; DIRO, 2019). A importância de métodos de diagnóstico menos invasivos reside na redução do desconforto e dos riscos para o paciente, além de proporcionar resultados mais rápidos e eficientes, possibilitando um tratamento mais ágil e melhorando o prognóstico da doença. A detecção de *Leishmania* por PCR convencional (cPCR) está documentada na literatura desde 1990, quando Smyth A.J et al. desenvolveram oligonucleotídeos sintéticos para a amplificação do DNA do protozoário a partir da amplificação de um DNA alvo em um termociclador aumentando a contração, o que aumenta a sensibilidade e a especificidade do teste (SMYTH et al., 1992).

## Metodologia

No presente estudo, foram analisadas amostras de plasma canino, cedidas pelo Laboratório Central Estadual do Rio Grande do Sul (LACEN-RS) provenientes de coletas de sangue total

encaminhadas de cidades de todo o estado do Rio Grande do Sul para o LACEN-RS com o intuito de investigação para casos suspeitos de LVC. As amostras possuíam resultados para *Leishmania* sp. em testes imunocromatográficos. Essas amostras foram armazenadas a -20°C até o momento de serem encaminhadas para o laboratório de biologia molecular da ULBRA para evitar degradação do material genético.

A extração do material genético do parasito das amostras foi realizada a partir do protocolo fornecido pelo fabricante do kit PureLink Genomic DNA Mini (Thermo Fisher Scientific) com algumas modificações para melhor adaptação de nossos equipamentos. A padronização do teste foi realizada com DNAs de *L. amazonensis*, extraídos de culturas cedido pelo laboratório de microbiologia do LACEN-RS, no termociclador Life Pro Thermal Cycler – Bior Servers Life. O DNA extraído e amplificado foi utilizado como controle positivo para as demais amplificações. Para que a reação de PCR, foi utilizado os seguintes primers P<sub>Fw</sub> – AGCTGGATCATTTCGATG e P<sub>Rev</sub> – TCGCACTTACTGCGTTCTT para se ligar ao DNA do parasito (SAGI et al., 2017). A reação de amplificação ocorreu com o processo de desnaturação inicial em 94°C por 15 minutos, 95°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos para o anelamento dos primers, 72°C por 30 segundos para a ligação da Taq DNA Polimerase, 72°C por 7 minutos para que pudesse ocorrer a amplificação e por último 4°C por tempo indeterminado para a conservação da reação, ao final totalizando 35 ciclos. O produto da amplificação foi analisado em eletroforese, utilizando gel de agarose 2,5%. O controle negativo era composto de água ultrapura no lugar de DNA e, para controle positivo foi adicionado DNA de *L. amazonensis*. Uma mistura de fragmentos de DNA 50 pb foi utilizado como marcador de tamanho. Após a análise, o material amplificado foi armazenado a -20°C para, posteriormente, ser analisado novamente, caso seja necessário.

## Resultados e Discussão

Reconhecendo a necessidade de testes que possam apresentar resultados com especificidade e sensibilidade elevadas, desenvolvemos este projeto para auxiliar no diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina

(LVC). A padronização foi realizada com DNAs em 5 reações com concentrações de 5µL, com volume final de 25µL e após a amplificação, foi possível verificar um fragmento no gel de agarose de tamanho aproximado de 500 pb. As condições de amplificação, bem como as quantidades de reagentes estão descritos na Tabela 1, multiplicando o volume de cada um conforme a quantidade de amostras processadas.

Tampão 10x	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,0 µL
dNTPs (10mM)	2,5 µL
Primer Fw	0,25 µL
Primer Rev	0,25 µL
Taq DNA polimerase (5U/ µL)	0,25 µL
H <sub>2</sub> O	18,25 µL
DNA genômico (80ng/ µL)	~8
Volume final da reação	25,0 µL

Tabela 1. Reagentes utilizados para a preparação da mix da reação

Após a determinação das condições de PCR com DNA de *L. amazonensis*, conduzimos testes em 20 amostras de plasma canino positivas para *Leishmania* sp. por imunocromatografia no LACEN-RS, visando a confirmação dos resultados. Após seguir os protocolos de extração e amplificação os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,5%. As amostras foram comparadas aos resultados imunocromatográficos existentes. Das 20 amostras analisadas, apenas uma apresentou um fragmento amplificado do material genético.

## Conclusão

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, predominante em áreas de difícil acesso à rede de saúde. Em 2022, foram registrados 12.953 casos de leishmaniose cutânea e 1.684 casos de leishmaniose visceral. (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2024).

Diante desse cenário, o diagnóstico molecular emerge como uma alternativa mais sensível e específica, oferecendo a possibilidade de identificação do parasito em apenas algumas horas. Tal agilidade pode significar não apenas um tratamento mais rápido e eficaz, mas também um controle mais eficiente da disseminação da doença. Considerando esse contexto, a presente pesquisa se justifica, portanto, pela necessidade de comparar métodos diagnósticos convencionais e explorar o potencial da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção da *Leishmania spp.*, contribuindo assim para a melhoria das estratégias de diagnóstico e intervenção tanto em medicina veterinária quanto em saúde pública.

Para garantir a confiabilidade dos resultados, todas as amostras foram analisadas em duplicata. Os dados obtidos neste estudo revelaram uma possível falha nos testes sorológicos de LVC, uma vez que os anticorpos de *Leishmania sp.* podem permanecer circulantes no organismo do animal mesmo após o período de tratamento e a cura. Embora a extração e amplificação de *L. amazonensis* tenham ocorrido conforme o esperado, apenas uma das amostras de plasma canino apresentou amplificação do material genético. Esses achados reforçam a importância da incorporação de métodos moleculares no diagnóstico da LVC, visando maior precisão e eficácia na detecção da infecção.

### Agradecimentos

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular, agradeço pela constante presença, colaboração e busca conjunta pelo conhecimento, exemplificando o verdadeiro espírito de equipe. Ao CEVS-RS (LACEN-RS), agradeço pelo encaminhamento das amostras analisadas neste estudo.

### Referências

BOELAERT, M. et al. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, [S.l.], v. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de

Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. 1. ed., 5. reimpr. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. *Boletim Epidemiológico: Doenças Tropicais Negligenciadas no Brasil*. jan. 2024.

FAKHAR, M. et al. Domestic dogs carriers of *Leishmania infantum*, *Leishmania tropica* and *Crithidia fasciculata* as potential reservoirs for human visceral leishmaniasis in northeastern Iran. *Vet Med Sci.*, v. 8, n. 6, p. 2329-2336, 2022.

GRIENSVEN, J. van; DIRO, E. Visceral leishmaniasis: recent advances in diagnostics and treatment regimens. *Infect Dis Clin North Am*, v. 33, n. 1, p. 79-99, mar. 2019.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.*, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Leishmaniasis*. Disponível em: [https://apps.who.int/neglected\\_diseases/ntdda/ta/leishmaniasis/leishmaniasis.html](https://apps.who.int/neglected_diseases/ntdda/ta/leishmaniasis/leishmaniasis.html). Acesso em: 4 jul. 2024.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. *Leishmaniose*. OPAS. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>. Acesso em: 17 abr. 2024.

PALTRINIERI, S. et al. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Vet Clin Pathol*, v. 45, n. 4, p. 552-578, dez. 2016.

PATIL, R.; MULIYIL, J.; A, N.; A, A.; K, M. A.; CHATTERJEE, P. Dynamics of the antibodies in cohorts of cured cases of visceral leishmaniasis: its implication on the validity of serological test, value in prognosis and in post therapeutic assessment. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 8, n. 6, p. 725-730, 2012.

SAGI, O. et al. Sensitive molecular diagnostics for cutaneous leishmaniasis. *Open Forum Infect Dis.*, v. 4, n. 2, p. ofx037, 2017.

SMYTH, A. J. et al. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, v. 105, Pt 2, p. 183-192, 1992.