



Centro Universitário de Brasília – UniCEUB
Faculdade de Ciências da Educação e Saúde

MATEUS PEDROSA DOMINGOS

**DESAFIOS NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: REVISÃO DE
LITERATURA**

Brasília - DF

2022

MATEUS PEDROSA DOMINGOS

DESAFIOS NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: REVISÃO DE LITERATURA

Monografia apresentada à Faculdade de Ciências da Educação e Saúde para obtenção do grau de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Lucas Edel Donato

Brasília - DF

2022

Mateus Pedrosa Domingos

DESAFIOS NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: REVISÃO DE LITERATURA

Monografia apresentada à Faculdade de Ciências da Educação e Saúde para obtenção do grau de bacharel em Medicina Veterinária.

Brasília, _____ de _____ de 2022.

Banca examinadora

Prof. Lucas Edel Donato

MV Neander Oíbio Costa

Prof. Cristiano Rosa de Moura

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença infecto-parasitária que é causada por protozoários do gênero *Leishmania*. É uma doença de difícil diagnóstico devido a diversidade de sinais clínicos, falta de singularidade dos sinais e alto custo e variedade de exames. Dentre essa variedade estão, teste rápido imunocromatográfico, os sorológicos, reação em cadeia da polimerase (PCR), imuno-histoquímico e exames parasitológicos. Além disso tudo é possível observar alterações hematológicas e renais. Assim, é importante saber avaliar os diferentes métodos diagnósticos, sabendo a vantagem e desvantagem de cada, juntamente com a clínica do animal para ter maior chance de assertividade na hora de escolher qual o meio de diagnóstico do paciente, nessa patologia que é tão complexa.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral , Diagnóstico, Elisa, Aspectos hematológicos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVO	8
3. METODOLOGIA	9
4. ALTERAÇÕES DE PELE.....	10
5. ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICO E PERFIL PROTEICO.....	10
6. FUNÇÃO RENAL	11
7. MÉTODOS SOROLÓGICOS	13
7.1 Imunocromatográfico.....	14
7.2 RIFI e ELISA.....	15
8. PARASITOLÓGICO... ..	16
8.1 Imunohistoquímico	17
9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	18
CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS.....	20

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma doença infecto-parasitária, causada por parasitas do gênero *Leishmania*, é endêmica em mais de 70 países, tem sido observada no mundo todo, principalmente no Brasil, que é o país com maior número de infectados da América Latina. A maioria das vítimas são de áreas rurais e periurbanas de menor renda. É uma doença negligenciada em muitos lugares, tem o cão como principal reservatório doméstico principalmente por poder armazenar, quando infectados, grande quantidade de macrófagos infectados em sua pele e pela sua proximidade com os seres humanos. Existem duas espécies de flebotomíneos, popularmente conhecido como mosquito palha, que são vetores no Brasil, a *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, que tem preferência por locais com altas quantidades de matéria orgânica (NAKASONE et al., 2019; SANTOS, 2015).

Os sinais clínicos de um cão infectado podem variar bastante, sendo sintomático, oligossintomático, ou assintomático que é a mais ocorrente. A pele dos cães é a região do corpo com maiores manifestações dos sinais clínicos, é também o local onde acontece a primeira interação entre o parasita e o sistema imune onde se encontra grandes quantidades de formas amastigotas. Lesões como alopecia e as dermatites são bastante encontradas na Leishmaniose Visceral Canina. Apesar de a maior parte dos cães não chegar a apresentar nenhum sinal clínico, a ausência de sinais na pele não diz sobre a presença ou não de parasitas neste local. Além disso, dependendo do estágio da doença, pode ocorrer onicogribose, esplenomegalia, linfadenomegalia, dermatite e ceratoconjuntivite. Lesão renal também é frequentemente vista associada à morte na LVC (MOTTA, 2021).

Para controlar a LVC, é extremamente importante detectar, quantificar e mapear animais infectados. Por isso, no Brasil, o teste de aglutinação direta (DAT) e o teste de triagem de aglutinação rápida (FAST) não são utilizados mais. O Ministério da Saúde distribui o teste rápido de plataforma dupla (DPP) para triagem, seguido do ensaio imunoenzimático (ELISA) para confirmação. A sensibilidade do DPP é questionável, principalmente com animais assintomáticos. Apesar disso, tanto o DPP quanto o ELISA podem apresentar especificidade baixa, prejudicando a triagem no Brasil. Os testes sorológicos tem limitações, pois podem apresentar reação cruzada com outras doenças. Por isso, testes mais eficientes devem ser combinados para melhor identificação dos infectados (BARBOSA, 2015).

O ciclo se desenvolve em 2 etapas, uma no hospedeiro mamífero e a outra no flebotomíneo. O desenvolvimento no mosquito ocorre no trato digestivo e na forma promastigota do protozoário, com seu flagelo exposto e se multiplicando por fissão binária no estômago. Apenas a fêmea é capaz de transmitir o protozoário, no momento do repasto sanguíneo as promastigotas são introduzidas na pele do cão, em seguida são fagocitadas por células como macrófagos, da imunidade inata. Dentro dessas células os protozoários se diferenciam em amastigotas, retraem o flagelo e começam a multiplicação por fissão binária. O macrófago é rompido com a alta quantidade de parasitas dentro dele, assim as amastigotas são liberadas na corrente sanguínea para serem fagocitadas novamente e repetirem o ciclo. Com essa disseminação dos parasitas para outros tecidos, há o acometimento de outros como medula óssea, fígado, baço e os rins (MOTTA, 2021).

2. OBJETIVO

Sabendo que apenas a análise clínica do animal não é suficiente para diagnosticar a LVC. É extremamente necessário a realização de exames complementares. Sabendo da dificuldade de estabelecer qual melhor método, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão de literatura sobre as técnicas diagnósticas disponíveis para detecção da LVC, comparar e analisar as diferenças, apontando suas vantagens, desvantagens, suas acurácias, relatar as possíveis alterações laboratoriais e clínicas. Com finalidade de concluir qual o mais adequado, ou qual combinação dentre eles é mais conveniente para se realizar o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.

3. METODOLOGIA

O estudo presente trata-se de uma revisão de literatura do tipo narrativa. Na qual a base do trabalho está em pesquisas de artigos científicos e artigos de revistas. foram realizadas nas seguintes plataformas: PubVet, Scielo, Capes, Google Acadêmico, PubMed. Para seleção dos artigos foi utilizado um critério temporal, com seleção de artigos apenas entre os anos de 2015 a 2022. As principais palavras chaves utilizadas foram: leishmaniose canina, diagnóstico, complexidade, dificuldade, alterações e testes. Não foram considerados sites comuns, artigos incompletos ou com temas não relacionados com este estudo.

4. ALTERAÇÕES DE PELE

Os testes diagnósticos da LVC são fundamentados pelos exames clínicos, físicos e laboratoriais, que são divididos nas técnicas parasitológicas, moleculares e sorológicos. Os exames físicos possuem limitações para os diagnósticos pela quantidade de cães assintomáticos, cerca de 50% dos infectados, ou com sintomatologia semelhante aos de varias outras doenças comuns em cães. Os sinais clínicos dermatológicos são considerados pelos veterinários como os principais indicadores de leishmaniose, pois cerca de 70% dos animais sintomáticos apresentam este tipo de manifestação clínica (COSTA et al., 2020).

As alterações mais comuns são dermatites com descamação em regiões de preferencia como a cabeça, orelha e extremidades, mas também com chances de ser generalizada e chegar a outros membros do corpo. Hiperqueratose nasodigital juntamente de queda de pelos e alopecia na região ao redor do olho também são frequentes. Demais achados recorrentes incluem onicogribose, ulceração de mucosas, despigmentação, e dermatites esfoliativa, ulcerativa, nodular ou pustular. Simultaneamente à LVC, devido à imunossupressão pelo parasita ou o ambiente, o animal ainda pode vir a apresentar infecções dermatológicas secundarias, tais como malassezia, dermatofitose e demodicose. Por se tratar de pele, os sinais devem ser diferenciados de lúpus, pênfigo foliáceo, dermatose, linfoma e adenite sebácea (COSTA et al., 2020; PINTO et al, 2016).

5. ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E PERFIL PROTEICO

Na avaliação do hemograma as alterações nos parâmetros mais frequentes que podem ser observadas são trombocitopenia, anemia geralmente normocítica, normocrômica e não regenerativa, hemácias aglomeradas (rouleaux), alterações variantes nos leucócitos, como linfopenia e desvio a esquerda, e o aumento da quantidade de proteína plasmática (MAIA, 2015; COSTA et al., 2020).

Anemia pode ter diferentes causas, baixa produção de eritrócitos por cronicidade da doença, resposta inflamatória, diminuição da eritropoietina, destruição e diminuição dos eritrócitos devido a falha na síntese de hemoglobina e escassez de nutrientes, como consequência de sequestro esplênico e hepático

causados pela produção de autoanticorpos. No esfregaço de sangue são capazes de apresentar as hemácias em forma de rouleaux devido ao aumento de globulina e a baixa de albumina nesses casos (MAIA, 2015; COSTA et al., 2020).

Os leucócitos podem variar bastante, como valores normais, leucopenia com uma linfopenia, ou leucocitose. A leucopenia, por neutropenia e linfopenia, se dá pelo alto grau de parasitas na medula óssea, que causa deficiência medular, e também pela alta divisão dos leucócitos para os outros órgãos. Já a leucocitose é prevista em respostas inflamatórias agudas. (LACERDA, 2017).

Mais um tipo de alteração bastante observada é a trombocitopenia, esta mudança pode ocorrer devido a aparição de imunoglobulinas anti-plaquetárias, ou pela presença de imunocomplexos na circulação, alterando a parede vascular (COSTA et al., 2020).

Animais reagentes também tendem a apresentar um aumento na concentração de proteína plasmática (PPT). Esse aumento é consequência da resposta imune humoral, que causa um ameno aumento das α e β -globulinas, e um grande aumento da gama-globulina. Ou seja, uma hiperproteinemia associada a uma hiperglobulinemia, elevando a proteína total apesar da redução da albumina (LACERDA, 2017).

A hipoalbuminemia é outra alteração comumente observada, e está ligada as lesões renais, desnutrição ou caquexia do animal, defeito na síntese devido a alteração hepática, e o aumento do catabolismo proteico. Devido as alterações nas quantidades dessas proteínas, ocorre a inversão da razão Albumina:Globulina, e com o maior o número de sinais clínicos, há também maior concentração de imunoglobulina, explicando a razão A:G observadas nos animais portadores da doença (GODOY et al., 2018).

6. FUNÇÃO RENAL

Os rins estão dentre os órgãos acometidos pela leishmaniose, e os cães acometidos pela doença muitas vezes apresentam alterações renais. A ureia e a creatinina, exames mais comuns para avaliação renal, geralmente apresentam valores aumentados nos casos de LVC e são mais uteis para avaliar apenas quando há mais de 75% da função renal comprometida. Como consequência disso, pode

haver a presença de proteinúria e hematuria no exame (COSTA et al., 2020).

A doença renal crônica é a principal causa de morte da LVC e é desenvolvida conforme a evolução da doença, geralmente quando atinge estágios mais severos e mais manifestações clínicas da doença (Quadro 1). As lesões renais acontecem como consequência da deposição de imunocomplexos nos glomérulos, causando diferentes graus de nefropatias e insuficiência (COSTA et al., 2020).

Quadro 1 – Estágios da Leishmaniose Visceral Canina

ESTÁGIO	SOROLOGIA ^a	EXAME FÍSICO	ALTERAÇÕES LABORATORIAIS	PROGNÓSTICO
I DOENÇA LEVE	Negativo ou baixo nível de anticorpos	Sinais leves, como linfadenopatias e dermatites papulares	Sem alterações importantes. Função renal normal: Creatinina < 1,4 mg/dl e ausência de proteinúria (UPC ^b < 0,5)	Bom
II DOENÇA MODERADA	Baixos a altos níveis de anticorpos	Sinais presentes no estágio I, associado a um ou mais dos seguintes sinais: lesões cutâneas localizadas ou difusas como dermatites esfoliativas e/ou onicogrifose, ulcerações (plano nasal, coxins, proeminências ósseas, junções mucocutâneas); anorexia; perda de peso; febre	Anormalidades clinicopatológicas leves como anemia arregenerativa, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia. subestágio (IIa) - perfil renal normal: creatinina < 1,4 mg / dl; ausência de proteinúria: UPC < 0,5 subestágio (IIb) - disfunção renal leve: creatinina < 1,4 mg / dl; UPC = 0,5-1	Bom a reservado
III DOENÇA GRAVE	Médios a altos níveis de anticorpos	Além dos sinais dos estágios I e II, os animais podem apresentar alterações relacionadas a deposição de imuno-complexos nos tecidos: vasculites, artrites, uveíte e glomerulonefrite	Anormalidades clinicopatológicas dos estágios I e II associado a doença renal crônica em estágio 1 (upc > 1) ou estágio 2 (creatinina 1,4-2 mg/dl), de acordo com critérios da <i>IRIS</i> ^c	Reservado a sombrio
IV DOENÇA MUITO GRAVE	Médios a altos níveis de anticorpos	Sinais clínicos do estágio III, associado a tromboembolismo pulmonar e/ou síndrome nefrótica e doença renal crônica em estágio terminal	Anormalidades clinicopatológicas listadas no estágio II, e doença renal crônica em estágio 3 (creatinina 2-5 mg/dl); ou estágio 4 (creatinina > 5 mg/dl) de acordo com critérios da <i>IRIS</i> ; ou síndrome nefrótica: proteinúria elevada: UPC > 5	Sombrio

^aNível de anticorpos anti- *Leishmania*: Negativo - Diluição reativa final da RIFI ≤ 1:40

Baixo - RIFI: 1:40 até 1:160

Médio - RIFI: 1:160 até 1:640

Alto - RIFI ≥ 640 (4 vezes maior que o *cut-off*)

^bUPC – Razão proteína/creatinina urinária

^cIRIS – *International Renal Interest Society*

Fonte: BARBOSA, 2015

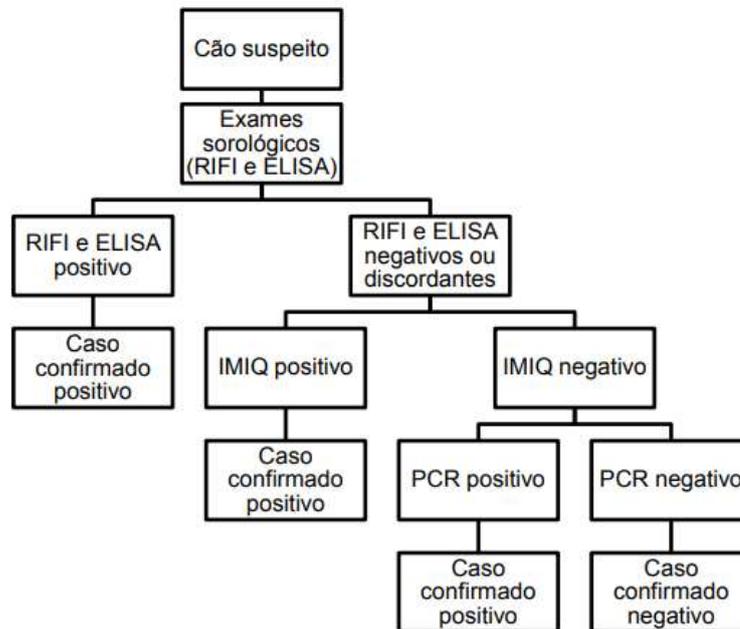
7. MÉTODOS SOROLÓGICOS

Até 2012 o teste de ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática) era usado como triagem e o RIFI como confirmatório da LVC pelo governo brasileiro, no “Programa de Controle da Leishmaniose Visceral”. Após esse ano o protocolo oficial da LVC foi modificado para o DPP como triagem e o ELISA como teste confirmatório (BARBOSA, 2015).

Animais infectados pela LVC tem uma grande produção de anticorpos (Quadro 1), podendo definir na manifestação clínica, causados devida a alta estimulação de linfócitos B nessa doença. Para realização destes métodos é utilizado o soro, obtido através da coleta de sangue, assim os meios sorológicos tem facilidade de serem realizados em relação aos parasitológicos, que são mais invasivos. O teste de dupla plataforma DPP, o ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) são as duas técnicas sorológicas utilizadas (LIMA et al., 2013; BARBOSA, 2015).

Em ambos os meios sorológicos é preciso realizar a contraprova com o exame parasitológico, principalmente quando o resultado é negativo (Figura 1). Isso ocorre devido à chance de reações cruzadas decorrentes de anticorpos que são produzidos por outras doenças, como: *Erhlichia* sp., *Babesia* sp, *Neospora* sp., *Trypanosoma cruzi*, *T. caninum*, uma vez que possuem epítomos em comum. Falsos negativos também são uma grande possibilidade nos testes sorológicos, presentes em animais com parasitas em incubação ou no período de soro conversão, fases em que os anticorpos sofrem variações. (COSTA et al., 2020; BARBOSA, 2015).

Figura 1 – Diagrama de diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina



Fonte: MAIA, 2013

7.1 IMUNOCROMATOGRÁFICO

O teste imunocromatográfico é utilizado geralmente como um meio de triagem, por ser um teste rápido tem vantagens como dispensar laboratório e equipamentos, facilidade de execução, baixa quantidade de amostra e verificação dos resultados de forma rápida. O DPP (Dual Path Plataform) é o principal teste, realizado com sangue total, plasma ou soro. É baseado no meio antígeno-anticorpo para detecção da presença de anticorpos. Neste teste, caso o resultado do animal for positivo, é indicado a realização de outros exames confirmatórios, se negativo a presença da doença é descartada no animal (NISHIDA E DELMASCHIO, 2017).

O DPP apresenta uma sensibilidade de cerca de 83% e especificidade em cerca de 73%(Quadro 2), que são menores comparados aos outros sorológicos, porém esses números abaxam mais ainda em animais sem nenhuma manifestação clínica. Pode-se dizer esse tipo de teste não tem capacidade de diferenciar os animais que estão realmente infectados de animais vacinados. Por isso a importância de verificar o histórico de alguma possível vacinação do animal, evitando falsos positivos (NISHIDA E DELMASCHIO, 2017).

Quadro 2 – Comparativo dos métodos de diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

TÉCNICA	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	VANTAGENS	LIMITAÇÕES
TESTE RÁPIDO	72-97%	61-100%	Manuseio simples	Não diferenciar animais infectados dos vacinados
ELISA	80 a 100%	71 a 98,3%	Coleta pouco invasiva	Reações cruzadas
RIFI	90%	80%	Coleta pouco invasiva	Reações cruzadas
PARASITOLÓGICO	Varia de acordo o material utilizado (53 a 86%)	100%	Padrão ouro Diagnóstico definitivo	Coleta invasiva
IMUNOHISTOQUÍMICA	70% a 80%	100%	Maior contraste e melhor visualização	Coleta invasiva
PCR	38% a 76%	100%	Diferentes tipos de amostras	Custo elevado

Fonte: COSTA, 2020

7.2 RIFI E ELISA

A técnica de RIFI na maioria das vezes é solicitada juntamente ao ELISA (Quadro 2), na realização deste teste as amostras são diluídas em soluções salinas tamponadas e colocadas em lâminas preenchidas com antígenos específicos da *Leishmania*. Em seguida são adicionados anticorpos anti-IgG para *Leishmania* spp. que estão marcados fluorocromo, que causa o efeito de fluorescência. Caso haja ligação dos anticorpos, o motivo é que o animal possui soro com IgG contra o antígeno. O padrão adotado para reagente é diluição inicial de 1/40, mas geralmente, na LVC, são encontrados títulos elevados, por causa da alta carga parasitaria nessa doença. A Imunofluorescência Indireta tem aproximadamente 90% de sensibilidade e 80% de especificidade (Motta, 2021).

Elisa, assim como RIFI, é bastante utilizado para diagnosticar a LVC e permite a detecção de antígenos e anticorpos pelas reações enzimáticas. Este método possui 4 tipos diferentes de realização e vantagens como grande quantidade de amostras de soro serem realizadas de uma vez, e utilização de antígenos recombinantes ou brutos. A especificidade de 71% a 98,3 e sensibilidade de 80% a 100% (Quadro 2), variam com antígeno utilizado e período de incubação do parasito. O antígeno que aumenta esses valores, e também diminui as atividades cruzadas, é o recombinante, usando a proteína rK39 por exemplo (BARBOSA, 2015).

Dentre os tipos de, temos o Elisa Direto com objetivo da indução do processo de reação, fazendo uso de uma enzima (geralmente a peroxidase) para que ocorra esta reação e seja visível a partir da coloração. Então utiliza-se anticorpos primários, conjugados a emissores de cor, anti-Leishmania em placas de poliestireno e são adicionadas as amostras (soro) específicas para buscar alguma indicação de reação de antígeno com os anticorpos. O Elisa Indireto é mais comum, e o que difere do direto é que são utilizados antígenos próprios da Leishmania ligados as placas, um anticorpo primário ligado ao antígeno e um anticorpo secundário marcado para gerar a emissão de cor. Já no Elisa Sanduiche, ou método de captura, são utilizados dois tipos de anticorpos, a primeira camada é utilizada na sensibilização da placa e adicionado o soro animal com presença de antígeno, causando reação. Após isso, é colocado um segundo anticorpo ligado a enzima que se ligará em outro epítipo do antígeno, causando a reação e a coloração devido a enzima. A intensidade da cor está relacionada ao número de reações. No Elisa Competitivo, as placas podem ser impregnadas com antígenos ou anticorpos. Se for com antígeno é adicionado soro do animal adicionados de mais anticorpos acoplados de enzimas, e caso seja com anticorpos são adicionados soro do animal com adicional de antígenos acoplados de enzimas. Assim, se houver quantidade de antígeno ou anticorpo nos soros utilizados, estes serão ligados a placa, e não os adicionados de enzimas (MOTTA, 2021).

8. PARASITOLÓGICO

Um dos mais utilizados pelos veterinários. Os parasitológicos se baseiam nos achados de parasitas, nas formas amastigotas ou promastigotas, em materiais aspirados das medulas ósseas, linfonodos ou tecidos em lâminas. As lâminas com materiais coletados são fixadas e coradas com as técnicas de Giemsa, Leishman ou Panótico. Ao observar na microscopia, as formas amastigotas apresentam um formato oval, esférico, com um núcleo grande e redondo. As amastigotas são encontradas em formato alongado e com um flagelo longo.

Esta é uma técnica que pode gerar bastante falsos positivos por limitações da técnica, como exemplo depender do número de parasitas na amostra coletada, da qualidade da amostra, da eficiência do patologista e a qualidade dos corantes

(COSTA et al., 2020).

A sensibilidade varia de acordo com o local e o tecido obtido. Quando aspirado da medula óssea apresenta uma sensibilidade de 50 a 83%, 30 a 85% dos linfonodos, enquanto o baço apresenta 98% de sensibilidade. A especificidade é considerada total e “padrão ouro” (Quadro 2), uma vez que quando parasita é encontrado na microscopia o diagnóstico da infecção é conclusivo (MOTTA, 2021).

O tecido medular pode ser considerado o ideal para achar o agente. A medula óssea há um grau de parasitismo insistente e sofre com alto acúmulo de amastigotas. Além disso é um local de coleta menos perigoso quando comparado à aspiração esplênica, por apresentar um risco menor de hemorragias (GODOY et al., 2018).

Segundo o estudo de GODOY, et al. (2018) Além da citologia aspirativa de medula óssea, a biópsia e citobloco são outras técnicas de identificação parasitária neste local. Ao comparar essas técnicas, o citobloco apresentou maior número de falsos negativos, precisou de mais campos visualizados para confirmação do agente e menor intensidade de parasitas nas lâminas. Contudo, o citobloco não mostrou ser o método para rapidez e quantificação parasitológica. Já a biópsia e a citologia aspirativa não apresentaram diferenças quanto ao número de falsos negativos e a disposição dos graus de parasitismo. Porém, a citologia aspirativa ainda é considerada a melhor técnica, pois apresenta maior facilidade de obtenção da amostra, menor processamento e custo da técnica.

8.1 IMUNOHISTOQUÍMICO

Outro método parasitológico é o imunohistoquímico (IHQ), esta técnica é feita pela identificação de parasitas através da realização de cortes dos pedaços de tecidos retirados por biópsia, mais comumente da pele, linfonodos e pavilhão interno auricular do que dos outros órgãos, e também durante necropsias. O exame é feito quando ocorre o reconhecimento e associação do antígeno de *Leishmania* spp. com um anticorpo primário, seguidamente da introdução de um anticorpo secundário que irá se ligar ao primeiro, permitindo a fluorescência e visualização do antígeno (LIMA, 2013).

Este tipo de método apresenta vantagens como poder ser realizados estudos

retrospectivos com a amostra, fácil manipulação, baixo custo, apresenta melhor visualização que os outros métodos parasitológicos devido ao contraste, permitindo uma sensibilidade de 70 a 80% e especificidade de 100% (Quadro 2), maior que a Histopatologia. Esta técnica apresenta como limitação a demora na sua operação (COSTA, 2020; GUERRA, 2016; LIMA, 2013).

9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

O PCR é um dos métodos mais utilizados na LVC, que consegue amplificar as sequencias de 120 pares de bases nitrogenadas do DNA, usando o par de oligonucleotídeos para *Leishmania*: 13A 5'-dGTG GGG GAG GGG CGT TCT3' e 13B 5'-dATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3. Com isso busca esse material genético do parasita nos tecidos do animal. Estes tecidos podem ser medula óssea, sangue (não recomendado devido baixa sensibilidade), pele, cortes histológicos e aspirados de linfonodos (COSTA, 2020; MOTTA, 2021).

O processo ocorre com a desnaturação, elevando a temperatura, da fita de DNA molde, para separação das fitas. Em seguida a temperatura é abaixada e são adicionados segmentos de ácidos nucleicos (primer), para que assim, a Taq polimerase consiga complementar a fita molde com adição das bases nitrogenadas e ocorrer a verificação da fita, com intuito de aparecer um genoma páreo com ao dos protozoários da LVC (HAAS, 2016).

Este teste possui entre 38% a 76% de sensibilidade e 100% de especificidade, por isso é importante ter conhecimento das limitações e vantagens. Pode ser realizado através de aspirados de linfonodos, baço, medula óssea e amostras de biopsia. O sangue também pode ser utilizado, porém não é recomendado devida sua baixa sensibilidade em casos de baixa carga parasitaria circulante ou na amostra coletada, por isso um único teste PCR negativo pode não ser o suficiente para descartar a doença. As desvantagens que este método apresenta como desvantagem a necessidade de laboratórios bem preparados, não é muito sensível comparado aos outros, alto custo, pode ocorrer falsos positivos dependendo da carga parasitaria do animal e o material genético pode não estar presente na amostra. (COSTA, 2020; MOTTA, 2021).

CONCLUSÃO

A leishmaniose é uma doença extremamente complexa e um desafio, tanto para os profissionais de saúde humana, quanto para os médicos veterinários. Existe hoje uma enorme dificuldade no diagnóstico desta doença, por ser complexa, pela ausência de sinais clínicos que são patognomônicos da doença, alta quantidade de infectados assintomáticos e pela grande variedade de exames diferentes no mercado e ausência de algum que tenha total sensibilidade.

Pela falta de um teste que seja 100% sensível e 100% específico, um único teste dificilmente será suficiente, então o ideal é fazer uma combinação entre mais de uma das técnicas diagnósticas e associar os resultados destes exames com os achados nos exames hematológicos e bioquímicos, sinais clínicos, na anamnese e no histórico epidemiológico do animal. É importante que o médico veterinário, na anamnese, consulte o quão disposto financeiramente o tutor está para conciliar na hora da escolha dos exames para LVC. O RIFI e ELISA é a combinação mais comum encontrado na rotina, por serem pouco invasivos, com acurácia relativamente boa, e mais baratos quando comparados a outras técnicas. Mesmo possuindo custos mais elevados, é possível dizer que o parasitológico e o PCR, apesar de terem a sensibilidade dependente da carga parasitária da amostra e da técnica, são os meios mais eficazes, devido possuírem 100% de especificidade. Assim com a melhor acurácia é possível evitar que cães falso negativos permaneçam despercebidos no ambiente, e cães falso positivos sejam eutanasiados ou tratados de maneira errônea.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, Camila Oliveira Silva. **Desempenho do teste imunocromatográfico rápido DPP® - Dual Path Platform para diagnóstico da leishmaniose visceral canina e reação cruzada com hemoparasitos**. Universidade Federal de Uberlândia. 2015. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/16718>>. Acesso em: 20 out. 2022
- COSTA, Graciele Pereira. et al. **Métodos de diagnóstico da leishmaniose canina: Revisão de literatura**. *Revista Saber Científico*. 2020. Disponível em: <<http://periodicos.saolucas.edu.br/index.php/resc/article/view/1497/1193>>. Acesso em: 15 nov. 2022
- GODOY, K. C. S. et al. **Técnicas de citologia aspirativa, biópsia e citobloco de medula óssea para identificação e determinação de intensidade parasitária na leishmaniose visceral canina**. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 70 (05). Sep Oct 2018. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/J5cFfKnXXSVZktmphrJXwmr/?lang=pt>>. Acesso em: 2 nov. 2022
- Guerra JM, Fernandes NCCA, Kimura LM, Shirata NK, Magno JA, Abrantes MF, et al. **Avaliação do exame imuno-histoquímico para o diagnóstico de Leishmania spp. em amostras de tecidos caninos**. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2016;75:1686
- HAAS, Dionei Joaquim; TORRES, Ana Caroline Doyle. **Aplicações das técnicas de pcr no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais**. *Revista científica de medicina veterinária - issn:1679-7353 ano xiv número 26 – janeiro de 2016 – periódico semestral*. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/5d3iu05eheenqpl_2017-1-12-8-29-47.pdf>. acesso em 20 out. 2022.
- LACERDA MS, SAMPAIO RL, REZENDE RS, GOMES AL. **Perfil hematológico de cães (Canis lupus familiaris) soropositivos para Leishmaniaspp.atendidos no Hospital Veterinário de Uberaba –MG**. *Nucleus Animalium*, v. 9, n. 1, 2017.
- LIMA, C.A. et al. **Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: uma revisão**. *PUBVET*, Londrina, V. 7, N. 25, Ed. 248, Art. 1641, Suplemento 1, 2013.
- MAIA, Laís Soares. **Leishmaniose visceral canina: aspectos clínicos e hematológicos de casos suspeitos e confirmados atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília em 2011**. Monografia – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- MOTTA, Leonardo Marchetti; EBERT, Kaio Gutieres; BATISTA, Keila Zaniboni. **Diagnóstico imunológico e molecular da Leishmaniose Visceral Canina: Revisão**. *Pubvet*. 2021. Disponível em: <<https://www.pubvet.com.br/artigo/838/diagnoacutestico-da-leishmaniose-visceral-canina-uma-revisatildeo>>. Acesso em: 1 nov. 2022

NAKASONE, E. K. et al. **The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: confronting old problems**. *Experimental parasitology*, v. 199, p. 9-16, 2019.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014489418304946?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 out. 2022

NISHIDA LHG, DELMASCHIO IB. **Leishmaniose Visceral Canina – Revisão de literatura**. *Revista Científica de Medicina Veterinária*, v. 1, n. 2, p. 07-15, 2017. Disponível

em:<http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/QKOlwIDa047cxSZ_2013-6-24-15-1-25.pdf>. Acesso em 25 out. 2022

PINTO, A. Z. L. et al. **Leishmaniose visceral canina: aspectos dermatológicos e dermatoses associadas**. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2016. Disponível em:

<<https://www.ufrgs.br/actavet/44/PUB%201362.pdf>>. Acesso em: 9 nov. 2022

SANTOS, Isabele Barbieri; SOUSA, Tatyere Constâncio; FRANCISCO, A. K. P. R. **Leishmaniose Canina em Brasília, DF: Uma Revisão da Literatura**. *Tempus actas de saúde colet*. Brasília, 9(3), 187-202, set, 2015. Disponível em:

<<https://tempus.unb.br/index.php/tempus/article/view/1796/1663>>. Acesso em: 10 nov. 2022

